

Université de Montréal

**Caractérisation spatiale des syncytia formés par le couplage des astrocytes du
noyau sensoriel principal du nerf trijumeau en fonction de la concentration de
calcium extracellulaire.**

Par
Raphaël Lavoie

Département de Physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc)
en Sciences Neurologiques
2-530-1-0

Janvier, 2012

©Raphaël Lavoie, 2012

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation spatiale des syncytia formés par le couplage des astrocytes du
noyau sensoriel principal du nerf trijumeau en fonction de la concentration de
calcium extracellulaire.**

Présenté par :

Raphaël Lavoie

Sera évalué par un jury composé des personnes suivantes

Vincent Castellucci	Président rapporteur
Arlette Kolta	Directrice de recherche
Richard Robitaille	Codirecteur
Hélène Girouard	Membre du jury

RÉSUMÉ

Le mouvement masticatoire est généré et coordonné par un générateur de patron central (GPC) situé au niveau du pont. Plusieurs résultats antérieurs de notre laboratoire soutiennent que le réseau de neurones à l'origine de la rythmogénèse est situé dans le noyau sensoriel principal du nerf trijumeau (NVsnpr). Ces mêmes expériences révèlent que des diminutions de la concentration calcique extracellulaire ($[Ca^{2+}]_e$) tiennent une place importante dans la génération des bouffées de décharges des neurones de cette région. Notre laboratoire tente de vérifier si la contribution des astrocytes à l'homéostasie de la concentration calcique extracellulaire est impliquée dans la genèse du rythme. Cette étude a pour but la caractérisation spatiale du syncytium astrocytaire au sein du NVsnpr dorsal et l'étude de l'effet de la $[Ca^{2+}]_e$ sur les propriétés astrocytaires électrophysiologiques et de connectivité. Nous avons utilisés pour ce faire la technique d'enregistrement par patch-clamp sur une préparation en tranche de tronc cérébral de rat. Nous démontrons ici que la diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ n'affecte pas les propriétés électrophysiologiques astrocytaires, mais induit une augmentation de la taille du syncytium. De plus, nous établissons l'existence au sein du NVsnpr dorsal d'une organisation anatomofonctionnelle du réseau astrocytaire calquée sur l'organisation neuronale.

MOTS CLES : Astrocyte, Syncytium, Calcium extracellulaire, Noyau sensoriel principal du trijumeau, Générateur de patron central, Mastication.

ABSTRACT

The masticatory movement is generated and coordinated by a central pattern generator (CPG) located in the pons. Previous results from our laboratory suggest that the neural network responsible for its rythmogenesis is located in the trigeminal main sensory nucleus (NVsnpr). Moreover, results indicate that in this region, decrease in extracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_e$) plays an important role in genarating burst. One of our laboratory's goal is to assess if the contribution of astrocytes to the extracellular calcium concentration homeostasis is involved in the genesis of the mastication rhythm. With this study, we characterized the astrocyte syncytium within the NVsnpr and measured the effect of $[Ca^{2+}]_e$ on the astrocytes electrophysiology and their networks. A patch-clamp recording technique in conjunction with a rat brain stem slice preparation was used. We demonstrate that a decrease in $[Ca^{2+}]_e$ does not affect the electrophysiological properties of astrocytes but induces an increase in the size of the syncytium. We also report the existence, within the dorsal NVsnpr, of an anatomofunctional organization between neurons and astrocytes.

KEYWORDS : Astrocyte, Syncytium, Extracellular calcium, Trigeminal main sensory nucleus, Central pattern generator, Mastication.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIERES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	XI
ABRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XV

INTRODUCTION	1
---------------------	----------

1. LA MASTICATION	3
1.1. LE MOUVEMENT MASTICATOIRE	3
1.2. ONTOGENIE DU MOUVEMENT MASTICATOIRE	8
1.3. FREQUENCE NATURELLE DU MOUVEMENT	11
1.4. ENCODAGE DES PATRONS MASTICATOIRES AU NIVEAU CORTICAL	12
2. SYSTÈME TRIGÉMINAL ET NOYAU SENSORIEL PRINCIPAL DU TRIJUMEAU	15
2.1. NVSNPR	19
3. LE GPC MASTICATOIRE	22
3.1. INTRODUCTION AUX GPC	23
3.2. UN GPC LOCALISE DANS LE TRONC CEREBRAL	25
3.3. MECANISME GENERATEUR DE RYTHME	30
4. HYPOTHESE DE TRAVAIL	34
5. LES CELLULES GLIALES DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	34
5.1. LES MICROGLIES	37
5.2. LES OLIGODENDROCYTES	37
5.3. LES CELLULES NG2 ⁺	38
5.4. LES ASTROCYTES	40
5.4.1. LES ASTROCYTES FORMENT UNE POPULATION CELLULAIRE NON HOMOGENE	46
5.4.2. LES CELLULES GLUT	49
5.4.3. LES CELLULES GLUR	51
5.4.4. ASTROCYTES A RECTIFICATION VARIABLE	53
6. LE SYNCYTIUM ASTROCYTAIRE	54
6.1. EXPRESSION DES CONNEXINES CHEZ L'ASTROCYTE	57
6.2. MODULATION DU COUPLAGE	58
7. BUT DU MEMOIRE	61

MATERIEL ET METHODES	63
-----------------------------	-----------

1. ANIMAUX ET ACQUISITION DES TRANCHES	65
2. ENREGISTREMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES	67
3. REVELATION DE LA BIOCYTINE	70
4. ANALYSE DES TRACES ELECTROPHYSIOLOGIQUES	71
5. ANALYSE DU COUPLAGE	72
6. ANALYSES DE L'EFFET DE LA POSITION	77
7. ANALYSES STATISTIQUES	78

RÉSULTATS **79**

1. PARAMÈTRES ET VARIABLES CONSIDÉRÉS LORS DE L'ANALYSE	81
1.1. <i>POURQUOI LE CALCIUM EXTRACELLULAIRE</i>	81
1.2. <i>POURQUOI ÉTUDIER LE SENS DE LA PERFUSION</i>	82
1.3. <i>POURQUOI ÉTUDIER LA POSITION</i>	84
2. NORMALITÉ DE LA DISTRIBUTION DES VALEURS MESURÉES	84
3. PROPRIÉTÉS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES	86
3.1. <i>EFFET DU CALCIUM EXTRACELLULAIRE</i>	87
3.2. <i>EFFET DU SENS DE LA PERFUSION</i>	89
3.3. <i>EFFET DE LA POSITION</i>	91
4. CONNECTIVITÉ DES ASTROCYTES	93
4.1. <i>EFFET DU CALCIUM EXTRACELLULAIRE</i>	94
4.2. <i>EFFET DU SENS DE LA PERFUSION</i>	97
4.3. <i>EFFET DE LA POSITION</i>	99
5. EXCENTRICITÉ ET ORIENTATION DU SYNCYTIIUM ASTROCYTAIRE	103
5.1. <i>EFFET DU CALCIUM EXTRACELLULAIRE</i>	109
5.2. <i>EFFET DU SENS DE LA PERFUSION</i>	112
5.3. <i>EFFET DE LA POSITION</i>	115

DISCUSSION **117**

1. CONSIDÉRATIONS FONCTIONNELLES	119
2. QUEL EST L'EFFET DE L'ABSENCE DU CALCIUM EXTRACELLULAIRE SUR LES ASTROCYTES DU NVSNPR-D	121
2.1. <i>CONNECTIVITÉ</i>	121
2.2. <i>DENSITÉ CELLULAIRE DES SYNCYTIA</i>	126
2.3. <i>PROPRIÉTÉS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES</i>	128
2.4. <i>FORME ET ORIENTATION DU RÉSEAU</i>	129
3. LA BIOCYTINE DIFFUSE-T-ELLE PAR LE MILIEU EXTRACELLULAIRE?	130
4. ORGANISATION ANATOMOFONCTIONNELLE DES ASTROCYTES	132
4.1. <i>ORIGINE DE LA LIMITATION À LA DIFFUSION</i>	136
5. LES CAUSES DE VARIABILITÉ	138
6. NOUVELLES CONSIDÉRATIONS SUR LE MODÈLE PROPOSÉ DE GPC	142
7. PERSPECTIVES	147
7.1. <i>SORTIR LES ENREGISTREMENTS DU NVSNPR-D</i>	148
7.2. <i>MARQUAGE DES CONNEXINES Cx43 ET Cx30</i>	148
7.3. <i>QUEL EST L'EFFET DU NMDA SUR LE SYNCYTIIUM ASTROCYTAIRE</i>	149
7.4. <i>AGONISTES ET ANTAGONISTES PURINERGIQUES</i>	150
7.5. <i>L'OPTOGÉNÉTIQUE</i>	151

CONCLUSION **153**

BIBLIOGRAPHIE **155**

Liste des Tableaux

Tableau I. Test de normalité de la distribution, en fonction du calcium Extracellulaire.	85
Tableau II. Test de normalité de la distribution, en fonction du sens relatif de la perfusion.	86
Tableau III. Statistiques descriptives des paramètres électrophysiologiques et test de comparaison non paramétrique U de Mann-Withney, en fonction de la concentration calcique extracellulaire.	87
Tableau IV. Statistiques descriptives des paramètres électrophysiologiques et test de comparaison non paramétrique de Mann-Withney (U), en fonction du sens relatif de la perfusion.	87
Tableau V. Statistiques descriptives des paramètres caractérisant le couplage intercellulaire et test de comparaison non paramétrique U de Mann-Withney, en fonction de la concentration calcique extracellulaire.	93
Tableau VI. Statistiques descriptives des paramètres caractérisant le couplage intercellulaire et test de comparaison non paramétrique de Mann-Withney (U), en fonction du sens relatif de la perfusion.	94
Tableau VII. Statistiques descriptives des paramètres associés à l'orientation du réseau et test de comparaison non paramétrique U de Mann-Withney, en fonction de la concentration calcique extracellulaire.	104
Tableau VIII. Statistiques descriptives des paramètres associés à l'orientation du réseau et test de comparaison non paramétrique de Mann-Withney (U), en fonction du sens relatif de la perfusion.	105

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Diversité des patrons masticatoires et organisation kinésiotopique de l'aire corticale masticatoire.	5
Figure 2. Résumé schématique de l'activité périphérique et centrale lors des différentes phases de la séquence de réduction du cycle masticatoire: la fermeture rapide (FR), la fermeture lente (FL) et l'ouverture (O).	7
Figure 3. Diagramme du complexe nucléaire sensoriel du nerf trijumeau, selon une perspective sagittale.	17
Figure 4. Innervation du noyau sensoriel principal du nerf trijumeau (NVsnpr) et organisation somatotopique du système trigéminal.	18
Figure 5. Modèle de GPC basé sur celui de Nozaki et coll. (1986).	26
Figure 6. Distribution et patron d'activité des neurones du NVsnpr.	29
Figure 7. Propriétés de décharges intrinsèques des neurones du NVsnpr.	32
Figure 8. Dendrogramme illustrant la diversité des types cellulaires du SNC, classés selon la ressemblance des patron de gènes exprimés.	36
Figure 9. Morphologie et domaine astrocytaire.	41
Figure 10. Diagramme illustrant le concept de synapse tripartite.	45
Figure 11. Diversité des sous-types d'astrocytes.	48
Figure 12. Formation et structure des jonctions gap.	56
Figure 13. Structure étudiée et enregistrements.	66
Figure 14. Mesures effectuées sur les réseaux et détermination de l'orientation préférentielle.	73
Figure 15. Classification des réseaux en fonction du sens relatif de la perfusion.	83
Figure 16. Boîtes à moustaches des paramètres électrophysiologiques en fonction de la concentration calcique extracellulaire.	88
Figure 17. Boîtes à moustaches des paramètres électrophysiologiques en fonction du sens relatif de la perfusion.	90
Figure 18. Interpolation des paramètres électrophysiologiques en fonction de la position dans le NVsnpr-D (n = 45).	92

Figure 19. Boîtes à moustaches des paramètres de couplage en fonction de la concentration calcique extracellulaire.	96
Figure 20. Boîtes à moustaches des paramètres de couplage en fonction du sens de la perfusion.	98
Figure 21. Interpolation des paramètres de connectivité en fonction de la position dans le NVsnpr-D (n = 45).	100
Figure 22. Interpolation de la densité des réseaux (cellules/mm ²) en fonction de la position de la cellule enregistrée, dans le NVsnpr-D.	102
Figure 23. Distribution et importance de l'orientation préférentielle.	107
Figure 24. Classification des réseaux en fonction de leur position dans le NVsnpr-D et moyenne de l'orientation préférentielle des réseaux.	108
Figure 25. Distribution des paramètres associés à l'orientation des réseaux, en fonction de la concentration calcique extracellulaire.	110
Figure 26. Distribution des paramètres associés à l'orientation des réseaux, en fonction du sens de la perfusion.	113
Figure 27. Interpolation des paramètres témoignant de l'orientation des réseaux en fonction de la position dans le NVsnpr-D.	116

ABRÉVIATIONS

[Ca²⁺]_e	Concentration calcique extracellulaire
ACM	Aire corticale motrice
ACMd	Région profonde de l'aire corticale masticatoire
ACMp	Région principale de l'aire corticale masticatoire
ACSF	Liquide cérébro-spinal artificiel
AFM	Microscopie à force atomique
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
CCPA	Conseil Canadien de Protection des Animaux
CDEA	Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux
CNST	Complexe nucléaire sensoriel du nerf trijumeau
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DIC	Optique en contraste de Normaski
eGFP	Protéine fluorescente verte amplifiée
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
GPC	Générateur de patrons central
IL-1β	Interleukine-1β
I-V	Relation courant-voltage
Kir_{4.1}	Canal potassique à rectification entrante de type 4.1
MAOA	Monoamine oxydase A
NMDA	N-méthyle-D-aspartate
NVinter	Région inter trigéminale
NVmot	Noyau moteur du Trijumeau
NVpéri	Région péritrigéminale
NVsnpr	Noyau sensoriel principal du Trijumeau
NVsnpr-D	Région dorsale du NVsnpr
NVsnpr-V	Région ventrale du NVsnpr
NVspc	Sous-section caudale du noyau trigéminal spinal
NVspi	Sous-section interpolaris du noyau trigéminal spinal
NVspo	Sous-section oralis du noyau trigéminal spinal
OPC	Cellule précurseuse d'oligodendrocytes
P2Y	Récepteur métabotrope de l'ATP
P2X	Récepteur ionotrope de l'ATP
PBS	Tampon phosphate salin
PCRt	Formation réticulée parvocellulaire
PPADS	acide pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonique
R_i	Résistance d'entrée
SEM	Erreur type de la moyenne
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale-α
VII	Nerf crânien facial
V_m	Potentiel membranaire de repos
XII	Nerf crânien hypoglosse

REMERCIEMENTS

Je tiens ici d'abord à remercier Dr Richard Robitaille pour m'avoir présenté à Dr Arlette Kolta et d'avoir ainsi rendu ce projet possible. Merci Arlette de m'avoir fait confiance, de m'avoir ouvert la porte de ton laboratoire et de m'avoir soutenu financièrement. Mon intérêt pour les interactions neurogliales date d'aussi loin que mon éveil pour les neurosciences et j'ai donc pour vous deux la plus profonde des reconnaissances. Merci enfin de m'avoir introduit au sein du GRSNC, une institution importante et remarquable où un étudiant curieux et intéressé est exposé à une science d'une qualité exceptionnelle et où il a l'opportunité d'y faire des rencontres qui marqueront toute sa carrière. Trop nombreux sont les chercheurs inspirants, que j'ai eu la chance d'y rencontrer, pour en faire une liste ici. Je tiens cependant à souligner un regretté disparu, Dr Jim P Lund et la chance que j'ai eue de le côtoyer. Merci à tous mes collègues de laboratoire et bonne chance dans vos projets futurs. Isabelle, tu n'as pas ton pareil pour mettre de l'ambiance dans un laboratoire et ce fut toujours un plaisir de travailler avec toi. Dorly, tu as des doigts de fées; tout ce que je sais du patch, c'est toi qui me l'as appris, merci. Pascal, grand-manitou, merci de m'avoir initié aux arcanes obscurs de Matlab. Merci Aude, Dominique, Jean-François, Gheylen, Laurent et Aurélie. Merci pour votre présence, vos conseils, le temps passé avec vous et votre amitié. Merci enfin à toute ma famille pour votre support et vos encouragements et plus particulièrement à toi Annick, ma fiancée, pour m'avoir compris et soutenu dans les moments les plus difficiles. Tu m'as permis de garder le cap. Je n'y serais pas arrivé sans toi. Je t'aime.

Septembre 2011

Raphaël Lavoie

Per aspera ad astra

INTRODUCTION

1. La Mastication

L'alimentation occupe une place centrale dans l'organisation de la vie chez l'ensemble des animaux ayant évolués au-delà du statut d'organismes filtreurs et, chez les mammifères, en étant à l'origine de la formation du bol alimentaire, la mastication est aux premières loges dans la chaîne d'évènements menant à la digestion des aliments ingérés. La diversité des régimes alimentaires rencontrés chez les mammifères a mené à sa complexification et à l'émergence d'une kyrielle de patrons masticatoires spécialisés. Mais, malgré les différences fondamentales retrouvées entre les patrons masticatoires des carnivores et des herbivores, certaines constantes suggèrent bien une base de mécanismes communs à l'ensemble des mammifères (Lund, 1991, pour une revue).

L'ingestion d'un aliment solide nécessite l'action coordonnée de nombreuses structures telles la langue, les muscles du visage et ceux responsables de l'ouverture et de la fermeture de la mâchoire. Ces structures sont respectivement innervées par les nerfs crâniens Hypoglosse (XII), Facial (VII) et Trigéminal (V), mais l'étude de la mastication ne se limite souvent qu'à l'étude du mouvement de la mâchoire résultant de l'activité du nerf V (Yamada et coll., 2005, pour une revue).

1.1. Le mouvement masticatoire

On distingue les groupes de muscles associés aux mouvements masticatoires selon qu'ils soient responsables de l'ouverture ou de la fermeture de la mâchoire. Les digastriques

antérieurs, mylohyoïdes et ptérygoïdes latéraux étant associés à l'ouverture, alors que ceux associés à la fermeture sont les muscles masséters, temporalis et ptérygoïdes médians. Outre les rongeurs, pour qui le mouvement masticatoire est souvent symétrique (Langenbach et Von Eijden, 2001), les mammifères présentent généralement un mouvement masticatoire pseudo-unilatéral. C'est-à-dire que l'essentiel du travail de transformation du bol alimentaire ne se produit que d'un seul côté à la fois, le côté opposé étant alors qualifié de côté balancier, car ce sont des mouvements latéraux de la mâchoire inférieure qui forment l'occlusion entre les dents inférieures et supérieures. Une bonne coordination bilatérale des muscles est malgré tout nécessaire à l'établissement d'un mouvement masticatoire cohérent et puisque l'innervation de ces muscles par les motoneurones est purement ipsilatérale (Batini et coll., 1976), la coordination des pools de motoneurones est donc essentielle à la mise en œuvre de la mastication.

Le mouvement masticatoire comprend l'ensemble des mouvements alternés, d'ouverture et de fermeture de la mâchoire, réalisés entre l'ingestion d'un aliment et sa déglutition. Chez le lapin, une séquence masticatoire se subdivise en trois phases distinctes. Les cycles masticatoires d'une même séquence ne sont cependant pas identiques et comme l'a souligné Lund (1991), « la grande variabilité retrouvée entre les cycles masticatoires d'une même phase, ne devrait pas être ignorée ou éliminée dans une tentative de décrire la mastication en une succession de cycles masticatoires moyens ». Différentes nomenclatures ont alors été développées; notamment en caractérisant la mastication selon les séquences d'activation des muscles d'ouverture et de fermeture de la mâchoire, telles qu'enregistrées par électromyographie (Schwartz et coll., 1989) ou en fonction du

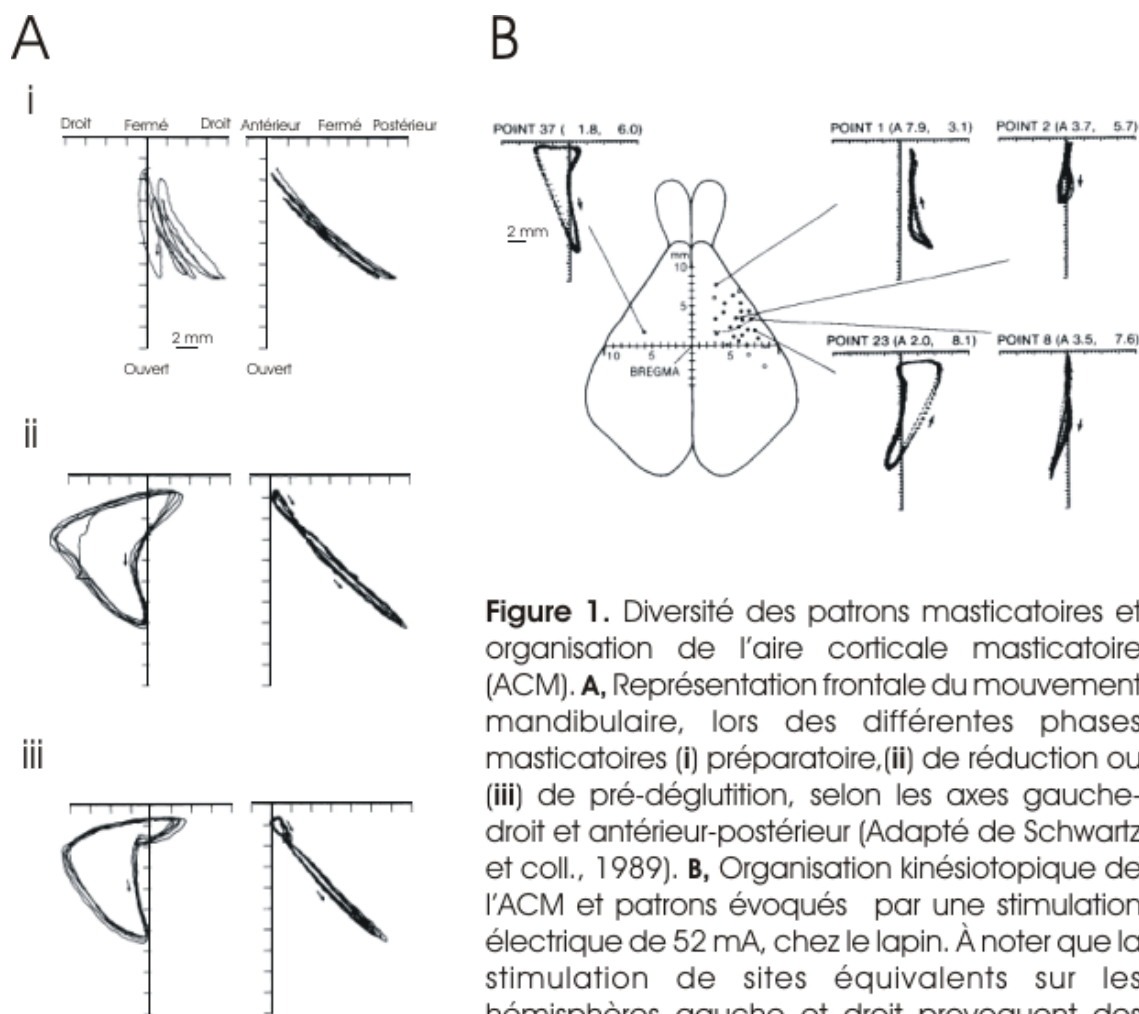


Figure 1. Diversité des patrons masticatoires et organisation de l'aire corticale masticatoire (ACM). **A**, Représentation frontale du mouvement mandibulaire, lors des différentes phases masticatoires (i) préparatoire, (ii) de réduction ou (iii) de pré-déglutition, selon les axes gauche-droit et antérieur-postérieur (Adapté de Schwartz et coll., 1989). **B**, Organisation kinésiotopique de l'ACM et patrons évoqués par une stimulation électrique de 52 mA, chez le lapin. À noter que la stimulation de sites équivalents sur les hémisphères gauche et droit provoquent des patrons masticatoires miroirs l'un de l'autre. (Adapté de Lund et coll., 1984).

mouvement du bol alimentaire, dans la cavité orale, enregistré par vidéofluorographie (Hiemae et coll., 1995; Yamada et coll., 2005, pour une revue).

Le premier type de cycle masticatoire est celui que l'on retrouve, pendant la phase « préparatoire » ou de « transport de type un », selon la nomenclature. Au cours de cette phase, les aliments sont sommairement découpés en morceaux plus facilement manipulables et, à l'aide de la langue et d'une forte activation des muscles d'ouverture de la mâchoire, acheminés vers les dents postérieures (voir Figure 1 Ai). Les mouvements mandibulaires associés à la séquence préparatoire sont caractérisés par deux phases; d'ouvertures et de fermetures rapides de la mâchoire (Lund, 1991; Yamada et coll., 2005, pour des revues).

La phase de réduction est la partie la plus étudiée de la mastication. C'est principalement dans ce second type de séquences motrices que la nourriture ingérée est réduite, par les molaires, sous une forme d'homogénat formant le bol alimentaire. Aux deux phases des cycles masticatoires associées à la séquence préparatoire, s'ajoute alors une phase de fermeture lente de la mâchoire (Figure 1 Aii et Figure 2). Cette phase de fermeture lente correspond à une forte augmentation de l'activité électromyographique des muscles associés à la fermeture de la mâchoire et à un mouvement de celle-ci en direction médiane, suivant le contact entre les dents et la nourriture. Les aliments sont alors progressivement broyés entre les molaires lors des phases de fermeture lente des cycles masticatoires. L'amplitude des mouvements verticaux de la mâchoire diminue au fur et à mesure de la réduction de la nourriture (Schwartz et coll., 1989).

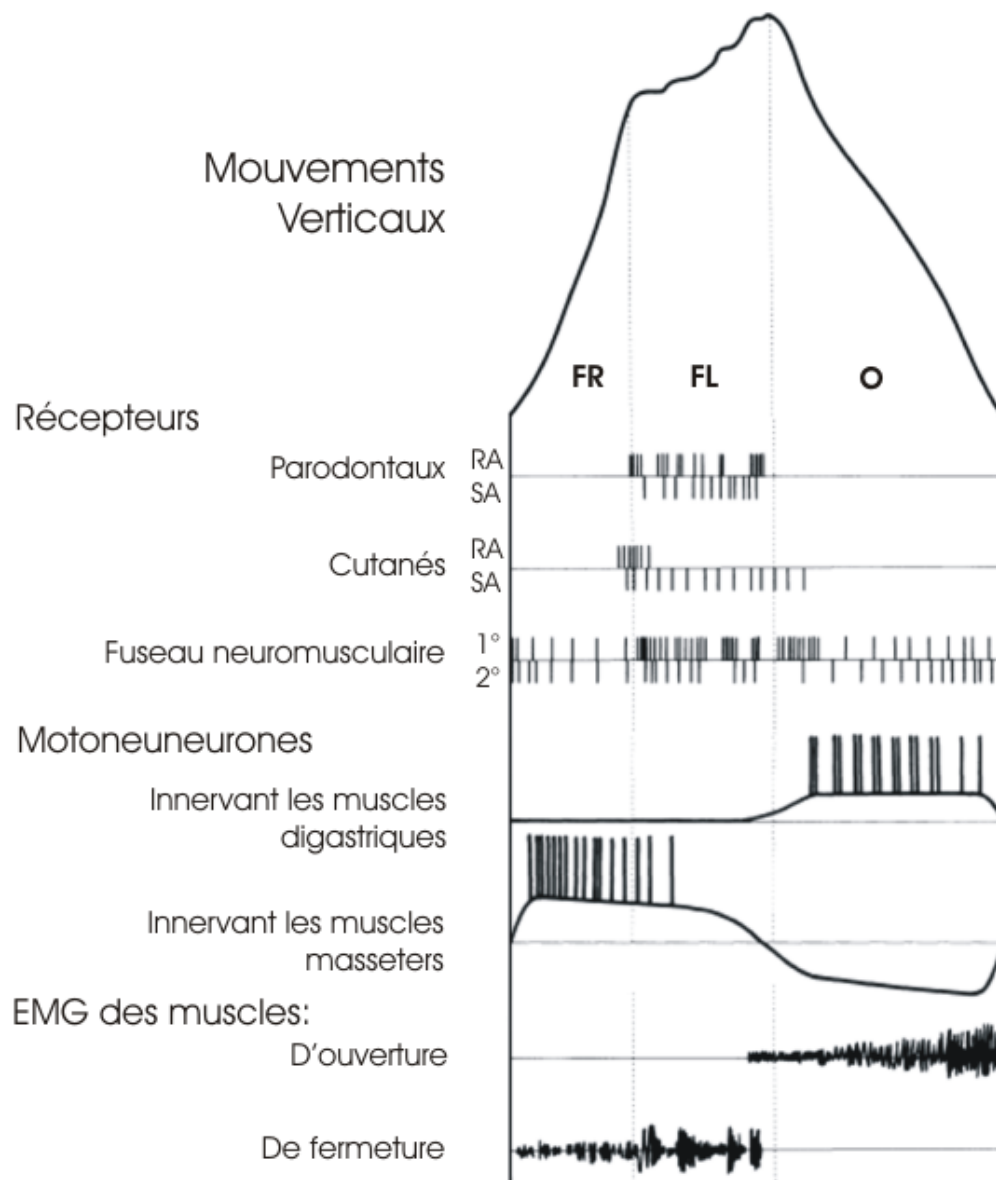


Figure 2. Résumé schématique de l'activité périphérique et centrale lors des différentes phases de la séquence de réduction du cycle masticatoire: la fermeture rapide (**FR**), la fermeture lente (**FL**) et l'ouverture (**O**). Les patrons de décharges des afférences périphériques arrivant au GPC masticatoire sont représentés en fonction de leur type et de leur provenance. Ce sont les récepteurs à adaptation rapide (**RA**) ou à adaptation lente (**SA**) parodontaux et cutanés, des lèvres et des muqueuses, de même que les afférences des fuseaux neuro-musculaires. La sortie du GPC masticatoire est illustrée par le potentiel membranaire des motoneurones innervant les masseters et digastriques ainsi que par l'activité électromyographique des muscles de fermeture et d'ouverture. (Adapté de Lund; 1991)

La troisième et dernière séquence, dite de « pré-déglutition » ou de « transport de type deux », rassemble la nourriture vers la cavité pharyngienne en vue d'être avalée (Figure 1 Aiii). Les cycles masticatoires formant cette séquence sont composés de cinq phases. Les phases de fermetures rapide et lente sont toujours présentes, mais la phase d'ouverture se subdivise alors en deux phases d'ouverture rapide séparées par une pause.

1.2 *Ontogénie du mouvement masticatoire*

Les premiers mouvements mandibulaires apparaissent, dès le stade embryonnaire, dans un ordre corrélé au développement neuromusculaire et conservé chez tous les mammifères (Narayanan et coll., 1971). Apparaissent d'abord les mouvements d'ouverture, puis de fermeture active de la mâchoire, les mouvements de la langue, puis ceux associés à la déglutition, aux lèvres et finalement les mouvements associés à la réduction des aliments (Lakars et Herring, 1980; Herring, 1985; Langenback et Van Eijden, 2001). Il y a cependant une grande différence entre les mammifères quant à la vitesse à laquelle se développent ces mouvements. Chez le rat, Ishihama et coll. (2003) ont montré, à l'aide d'une préparation *in vitro* de tronc cérébral en bloc, que le circuit soutenant l'activité rythmique des motoneurones trigéminaux est présent dès E-20. Chez l'homme, au contraire, le réflexe d'ouverture n'apparaît qu'à la 9^{ème} semaine de gestation (Humphrey, 1964). Les mouvements de succion se stabilisent ensuite, chez la plupart des mammifères, dans les jours précédant la naissance (Herring, 1985).

L'apparition des molaires précède de peu l'émergence des premiers mouvements masticatoires. Ce moment survient à P12 chez le rat (Westneat et Hall, 1992), P13 chez le lapin (Lagenbach et coll., 1992), mais survient *in utero* chez le cochon d'Inde (Teaford et Walker, 1983). Westneat et Hall (1992) ont étudié la transition entre les mouvements de succion et de mastication chez le rat nouveau-né. Ils ont montré qu'à l'apparition des premiers mouvements masticatoires, les phases de contraction des masséters et digastriques sont partiellement superposées; que ce n'est qu'entre P18 et P21 que les phases de contractions des muscles associés à la fermeture et à l'ouverture de la mâchoire deviennent bien dissociées et que s'établit le patron moteur mature que l'on retrouve chez l'adulte. Dans l'optique où il est difficile de faire la part de chose entre les rythmes présents et de déterminer exactement le moment où émerge le réseau responsable de la mastication, il paraît donc plus judicieux, du moins lors d'étude chez le nouveau-né, de parler « d'activité trigéminal rythmique », plutôt que de mastication ou succion.

Westneat et Hall (1992) et Lagenbach et coll. (1992) ont suggéré que le substrat neuronal, à la base de la mastication, pouvait n'être qu'une évolution de celui lié à la succion. Ils ont basé leur hypothèse sur les similarités respectivement observées chez le rat et le lapin, entre les enregistrements électromyographiques des deux patrons moteurs et sur le fait qu'ils sont ontogéniquement consécutifs. Il y a cependant de grandes différences, entre ces patrons moteurs alimentaires. La principale étant que la force utilisée, lors de la mastication, pour broyer la nourriture, provient de l'activité des muscles de fermeture de la mâchoire, alors que celle utilisée lors du mouvement de succion provient essentiellement des muscles d'ouverture (Colley et Creamer, 1958)

et/ou d'un mouvement de recul de la langue (Ardran et coll., 1958 ; Langenback et Van Eijden, 2001). Est-ce que le circuit soutenant la mastication apparaît suite à la modification de propriétés intrinsèques des cellules incluses dans le réseau impliqué dans la succion? Émerge-t-il parallèlement et/ou apparaît-il suite à la disparition de circuits locaux inhibiteurs? Aucune étude n'a jusqu'à aujourd'hui permis de trancher. Par contre, il est bien établi que plusieurs modifications des propriétés des cellules impliquées dans la mastication coïncident avec l'apparition de la mastication. Notamment, dans les jours précédents l'apparition du patron masticatoire, chez le rat, une augmentation de l'expression du co-transporteur K^+/Cl^- KCC2, dans les motoneurones des noyaux NVmot et XII (Riviera et coll., 1999), induit une transition de l'effet de la glycine, de dépolarisant à hyperpolarisant (Ben-Ari, 2002). De plus, il a été montré que le récepteur NMDA, parallèlement à l'apparition de la mastication, subit une modification de sa composition pouvant grandement influencer sa perméabilité au Ca^{2+} (Turman 2007, pour une revue). En effet, l'expression des sous-unités NR2A et NR2B augmente dans les cellules du noyau mésencéphalique du Trijumeau (MesV) lors de l'apparition des incisives et celle de la sous-unité NR3B augmente au moment où se consolide le patron masticatoire adulte (Ishihana et Turman, 2006). Enfin, notre laboratoire a publié des résultats cruciaux montrant que, dans la région rostro-dorsale du noyau trigéminal sensoriel principal (NVsnpr), l'expression d'une conductance sodique persistante apparaissant de concert avec la mastication induit un changement du type de décharge dans ces cellules. Ainsi, le pourcentage de cellules déchargeant en bouffées rythmiques passe de 6% à P12 à 25% à P13 et enfin plafonne à 44% à P14, ce qui fait de cette population de neurones une excellente candidate pour former le générateur de rythme à la base de la mastication (Tsuboi et coll., 2003 ; Brocard et coll., 2006).

1.3 Fréquence naturelle du mouvement

Le rythme masticatoire d'une espèce est vraisemblablement inversement proportionnel à sa taille. Pour la phase de réduction, lors de la mastication d'aliments durs, la fréquence masticatoire a été rapportée à 5,6 Hz, chez la souris (Kobayashi et coll., 2002), entre 4,0 et 5,0 Hz, chez le rat (Wesneat et Hall, 1992), 6,3 Hz chez le cochon d'inde (Byrd, 1981), 4,1 Hz chez le lapin (Naganuma et coll. 2001), 3,2 Hz chez le chat (Hiimae, 1981) et 1,5 Hz, chez l'humain (Peyron et coll., 2002). Druzinsky (1993) a d'ailleurs quantifié et généralisé cette relation, en se basant sur l'observation de spécimens de 26 espèces de mammifères, et montré que la fréquence masticatoire moyenne au sein d'une espèce est égale à sa masse corporelle à la puissance -0,128.

Cependant, plusieurs paramètres influencent la fréquence masticatoire et au sein d'une même espèce, la dynamique masticatoire n'est pas homogène ou constante. Ainsi, Peyron et coll. (2002 et 2004) ont montré, chez l'homme, que le sexe et l'âge influent sur le patron masticatoire utilisé lors de l'ingestion d'une nourriture standardisée, mais aussi que la majeure partie de la variabilité observée s'expliquait par des différences individuelles. De plus, chez un même individu, le patron d'activation électromyographique varie grandement en fonction du type d'aliments consommés (Liu et coll., 1993) et au fil de la transformation de l'aliment, au cours de la mastication (Thexton et coll., 1983; Lund et Olsson, 1983). Cette observation montre bien l'importance de l'influx sensoriel pour l'exécution d'une mastication efficace (Lund et Koltá, 2006, pour une revue).

1.4 Encodage des patrons masticatoires au niveau cortical

Les travaux de Sir. David Ferrier ont permis de montrer, dès 1886, qu'il est possible de générer un patron moteur très semblable à la mastication par l'application de stimulations électriques au niveau du cortex sensorimoteur, chez le lapin (Ferrier, 1886). L'observation a ensuite été reprise par de nombreuses études, chez de nombreuses espèces, comme le rat et les primates, mais les principaux modèles animaux utilisés, lors des études consacrées à la genèse de la mastication, sont le lapin, le cochon d'inde et le chat, en raison de la grande ressemblance entre le patron moteur suivant la stimulation et le mouvement masticatoire naturel (Lund, 1991).

L'ensemble des régions corticales dont la stimulation est apte à induire le mouvement des structures impliquées dans le comportement masticatoire est appelé l'aire corticale masticatoire (ACM). Chez le lapin et le cochon d'inde, l'ACM chevauche les représentations des muscles du visage, des lèvres, de la langue et de la mâchoire, dans les cortex moteur et sensoriel primaire (Bremer, 1923; Goldberg et Tal, 1978; Lund et coll., 1984; Nozaki et coll., 1986; Liu et coll., 1993). Chez le chat, L'ACM est localisée dans le gyrus orbital (Morimoto et Kawamura, 1973; Hiraba et Sato, 2004). Alors que chez les primates, elle a classiquement été localisée dans la portion la plus inférieure du gyrus précentral et dans la région postcentrale adjacente (Lund et Lamarre, 1974), mais selon Huang et coll. (1989), quatre aires corticales ont une représentation du mouvement rythmique de la mâchoire : le cortex moteur primaire associé au visage et la région qui y est immédiatement latérale, l'aire corticale masticatoire principale (ACMp), le cortex

sensoriel primaire associé au visage et la surface intérieure de l'opercule frontal; une région en profondeur par rapport à l'ACM (ACMd) (Yamamura et coll., 2002).

L'induction de la mastication, par des stimulations électriques de l'ACM et des voies cortico-fugales, nécessite que ces stimulations soient sous la forme de trains, d'une fréquence allant de 10 à 100Hz et d'une durée supérieure à 100ms. Le rythme masticatoire obtenu est alors, dans une vaste mesure, indépendant de la fréquence de stimulation. Ainsi, le rythme masticatoire obtenu par Dellow et Lund (1971) reste, à toutes fins pratiques, inchangé entre des fréquences de stimulations allant de 20 à près de 200 Hz. Selon ces auteurs, la longue période de latence séparant le début de stimulation et l'apparition du mouvement masticatoire (pouvant aller de 200ms à 10sec, en fonction de la fréquence de stimulation) ne peut s'expliquer par le délai synaptique entre la voie corticobulbaire et les noyaux moteurs crâniens, puisque des réponses sont observées dans ces derniers à très courte latence (Haartsen, 1962). Ils suggèrent plutôt que ce délai représenterait le temps nécessaire au recrutement de neurones, au sein du GPC masticatoire, pour la formation d'un patron masticatoire précis; une hypothèse qui concorde avec les observations réalisées plus tard par Westberg et coll. (1998). Dans l'optique où l'animal installé dans la chambre stéréotaxique est généralement anesthésié et paralysé, il est important de noter que l'on parle ici de « mastication fictive ». C'est alors l'activité alternée des motoneurones innervant les muscles antagonistes responsables de l'ouverture et de la fermeture de la mâchoire, qui est enregistrée.

Bremer (1923) a été le premier à montrer que des patrons masticatoires différents sont obtenus lorsque l'on modifie le site de stimulations corticales. Lund et coll. (1984) ont

par la suite montré que la stimulation de la région antérieure de l'ACM, chez le lapin, induit un patron masticatoire associé aux mouvements de la séquence préparatoire, alors que dans la région postérieure de l'ACM, le patron induit est associé à la séquence de réduction. Ils ont aussi montré que la stimulation unilatérale de régions équivalentes sur les deux hémisphères produit des patrons moteurs miroirs l'un de l'autre (Figure 1B). Ces résultats suggèrent que, contrairement à d'autres mouvements rythmiques comme la locomotion et la respiration, il y a non seulement, au sein du cortex, une organisation somatotopique des muscles associés aux structures orofaciales, mais aussi une organisation kinésiotopique des patrons masticatoires.

L'ACM se trouve dans les deux hémisphères, mais l'activité masticatoire résultant de la stimulation unilatérale de l'ACM, induit néanmoins un patron d'activité bilatéral cohérent. Nozaki et coll. (1991) ont cependant montré que suite à une lésion médullaire le long de la ligne médiane, il ne demeure que l'activité rythmique contralatérale et dans ces conditions, une stimulation bilatérale de fréquences différentes peut engendrer deux rythmes masticatoires différents de chaque côté de la mâchoire. Ces résultats supportent l'idée selon laquelle les neurones de l'ACM ne projettent que contralatralement et que ce sont des interneurones commissuraux qui assureraient la cohérence de l'activité des populations de neurones contrôlant les deux moitiés du visage.

Les études explorant l'impact d'une ablation ou d'une inactivation de l'ACM ont démontré l'incapacité d'initier volontairement le mouvement masticatoire suite à une telle lésion; chez l'homme (Penfield et Rasmussen, 1950), le lapin (Enomoto et coll., 1987) ou le singe (Yamamura et coll., 2002 ; Narita et coll., 2002). Ces résultats

démontrent bien la codification des patrons au niveau cortical, mais pas que ce niveau d'organisation est nécessaire au déroulement et au maintien de la mastication. Le niveau d'activité des neurones des régions masticatoires corticales est d'ailleurs bien supérieur pendant l'ingestion, que pendant la mastication en soi.

2. Système trigéminal et noyau sensoriel principal du trijumeau

Le nerf trijumeau est le principal nerf associé à la mastication et le plus gros des nerfs crâniens. Il est à la fois responsable de l'innervation somesthésique des méninges et de toute la région orofaciale ainsi que de l'innervation motrice des muscles masticatoires. On dit qu'il a donc une fonction mixte. Il possède l'équivalent d'un ganglion rachidien, le ganglion trigéminal, où se trouvent les corps cellulaires des neurones sensoriels. Les neurones innervant les fuseaux neuromusculaires font cependant exception à la règle, car ils ont leur corps cellulaire niché directement à l'intérieur du tronc cérébral, au sein du noyau mésencéphalique; à proximité du NVmot. Le nerf trijumeau émerge du ganglion vers la périphérie et se subdivise en trois branches ramifiées dont il tire son nom : les nerfs ophtalmique, maxillaire et mandibulaire (Figure 3). Le nerf ophtalmique innerve les mécanorécepteurs et nocicepteurs de la région faciale et des muqueuses sinusales, alors que les nerfs maxillaires et mandibulaires, innervent respectivement la partie supérieure et inférieure de la cavité buccale et comme leur nom l'indique, la région du maxillaire et de la mandibule (Figure 4). C'est aussi par le nerf mandibulaire que transigent les commandes effectrices vers les muscles masticatoires, puisque les axones

provenant du NVmot forment la racine motrice trigéminal, sortent du tronc et rejoignent le ganglion, où ils s'insèrent dans le nerf mandibulaire.

Les prolongements centraux émergeant du ganglion trigéminal forment le tractus sensoriel trigéminal et guidés par l'expression de *hoxa2* par le neuroépithélium, pénètrent dans le tronc cérébral au niveau du 2^e rhombomère (Oury et coll., 2006). Cela se produit à E10 chez la souris et E12 chez le rat (Erzurumlu et Killackey, 1983; Lumsden et Kaynes, 1989). Une fois dans le SNC, ces afférences divergent et se ramifient en une branche ascendante et descendante pour innerver les neurones sensoriels secondaires du complexe nucléaire sensoriel trigéminal (CNST). Le CNST s'étend d'un bout à l'autre du tronc cérébral ; des limites caudales du mésencéphale jusqu'aux premiers segments cervicaux de la moelle épinière. Il a été défini par Olszewski (1950) comme étant constitué des noyaux NVsnpr et des trois subdivisions du noyau spinal du nerf trijumeau (*pars oralis*, NVspo, *interpolaris*, NVspi et *caudalis*, NVspc) avec ces quatre noyaux alignés dans cet ordre le long de l'axe rostro-caudal (Figure 3).

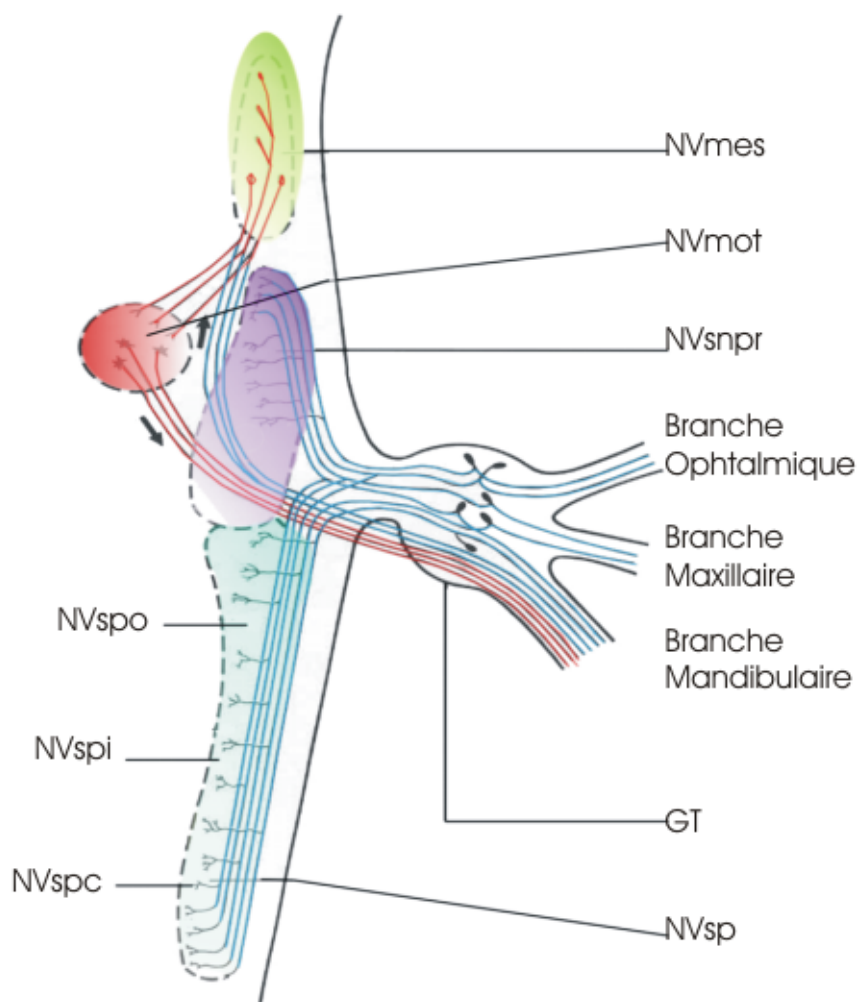


Figure 3. Diagramme du complexe nucléaire sensoriel du nerf trijumeau, selon une perspective sagittale. Les prolongements centraux des fibres sensorielles quittant le ganglion trigéminal (GT) atteignent le noyau sensoriel principal du trijumeau (NVsnpr, en mauve) et les trois subdivisions du noyau spinal du trijumeau (NVsp; en bleu), pars Oralis (NVspo), Interpolaris (NVspi) et Caudalis (NVspc). Les fibres du noyau moteur (NVmot) et celles associées au noyau mésencéphalique du nerf trijumeau (NVmes) y sont représentées en rouge. (Adapté de Bernier, 2007)

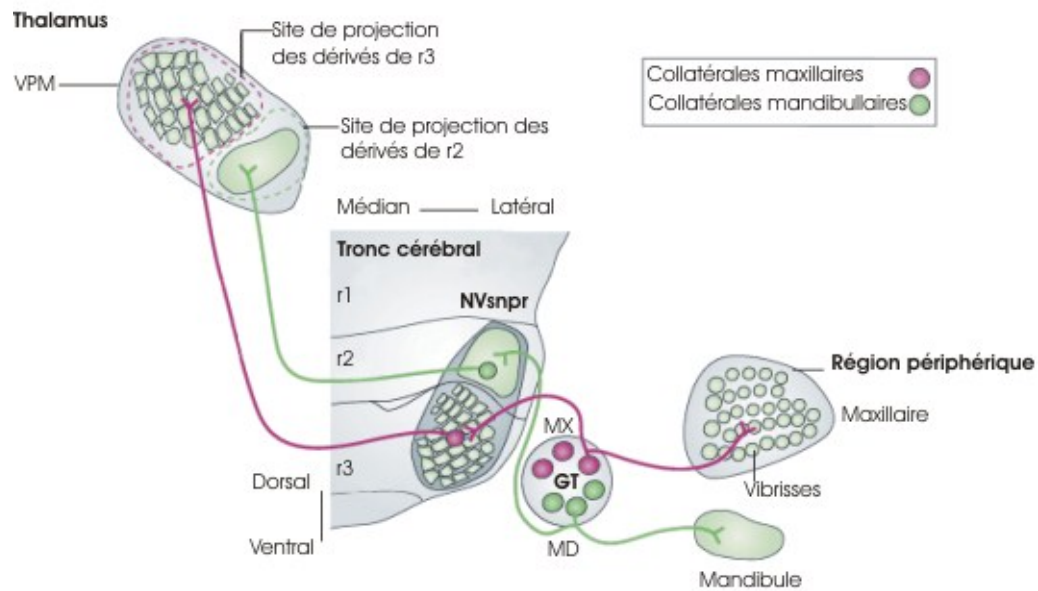


Figure 4. Innervation du noyau sensoriel principal du nerf trijumeau (NVsnpr) et Organisation somatotopique du système trigéminal; du ganglion (GT), jusqu'au sous-noyau postémomédian ventral (VPM) du thalamus. (Adapté de Erzurumlu et coll., 2010)

Des afférences émises à partir de ces structures rejoignent le lemnisque médian et atteignent les noyaux ventropostéromédian et postéromédian contralatéraux du thalamus, qui relayent par la suite l'information somesthésique vers le cortex somatosensoriel primaire (Figure 4). Des projections provenant de la région rostrale du NVsnpr-D transmettent de plus l'innervation proprioceptive au thalamus ipsilatéral en empruntant le tractus trigémino-thalamique dorsal.

2.1. *NVsnpr*

Les premiers travaux sur le NVsnpr ont été réalisés chez le lapin et le chat. Chez ces espèces, le NVsnpr est retrouvé 6 à 10 mm rostralement à l'Obex et 3,5 à 5,5 mm latéralement à la ligne médiane (Eisenman et coll., 1963). Son pôle rostral est aligné sur celui du NVmot et le noyau s'étant caudalement sur environ 2,5 mm, correspondant dans un contexte plus général au pôle rostral du NVII. D'un point de vue ontogénique, cela correspond aux limites rostrales et caudales formées par les dérivés des rhombomères r2 et r3. En coupes transversales, il prend grossièrement la forme d'une arachide, mais les détails de sa forme varient le long de l'axe rostro-caudal.

Les neurones sont rassemblés, au sein du NVsnpr, dans un enchevêtrement densément formé de cellules rondes ou ovoïdes qui sont de plus petite taille que dans les autres régions du CNST ; le diamètre variant typiquement entre 8 et 20 μm alors que des neurones dont le diamètre varie entre 22 et 40 μm sont très nombreux au sein du NVsp

(Ide et Killakey, 1985). Le NVsnpr ne forme cependant pas une structure cytoarchitecturalement et fonctionnellement uniforme (Eisenman et coll., 1963 ; Bates et Killakey, 1985 ; Shigenaga et coll., 1986). Il est d'ailleurs classiquement divisé en une région dorsale et ventrale (NVsnpr-V), dont la région dorsale dérive uniquement de r2 et la région ventrale de r3. Ceci a pour effet de créer un fort gradient d'expression entre ces régions, pour de nombreux gènes servant de signaux de guidage, dont *Hoxa2* et *Hoxb2* (Oury et coll., 2006), mais aussi toute une cascade de gènes impliquant *Krox-20*, *Lmx1b*, *Drg11*, *EphA*, *Tlx3*, *Slit1* et *Robo1-3*, menant à la ségrégation des afférences et à la désignation du patron de différenciation cellulaire (Jacquin et coll., 1996; Dai et coll., 2008 ; Jacquin et coll., 2008 ; Xiang et coll., 2010). Il en résulte que les afférences provenant des neurones sensoriels primaires forment, au sein du NVsnpr, une représentation somatotopique inversée, avec les mandibulaires retrouvées dans la région dorsale, les maxillaires dans la région centrale et les ophtalmiques dans la région ventrale du noyau (Erzurumlu et coll., 2010, pour une revue).

À son pôle rostral, le NVsnpr contient dans sa région dorso-médiane un îlot de neurones densément arrangés (Eisenman et coll., 1963). Les afférences périphériques y parvenant sont essentiellement originaires de structures intraorales (Takemura et coll., 1991). Ces afférences provenant des neurones sensoriels primaires ont été confirmées être de nature glutaminergique et induire une activation des récepteurs NMDA et AMPA (Waite et coll., 2000). Il a aussi été montré que ces afférences subissent une modulation présynaptique par des terminaisons GABAergique et glycinergique (Bae et coll., 2000-2003-2005).

L'activité des neurones du NVsnpr-D est de plus grandement régulée. Les neurones du NVsnpr concentrent en effet une grande quantité d'afférences provenant non seulement de la périphérie, mais également de voies cortico-fugales, de projections intratrigéminales ascendantes provenant des autres régions du CNST, des neurones de la formation réticulée pérित्रigéminale (NVpéri), du noyau rouge, du raphé et d'une population d'interneurones située dans le NVmot (Eisenman et coll., 1963; Olsson et coll., 1986; Donga et Lund., 1990-1991; Jacquin et coll., 1990; Inoue et coll., 2002 ; Athanassiadis et coll., 2005b ; McDavid et coll., 2006). La nature de ces autres afférences est principalement glutaminergique, mais inclus aussi une composante GABAergique et glycinergique non négligeable (Turman et Chandler, 1994 ; Kolta et coll., 2000 ; Bourque et Kolta, 2001 ; Athanassiadis et coll., 2005b ; McDavid et coll., 2006-2008).

De plus, bien que le NVsnpr aie classiquement été considéré comme un relais sensoriel au thalamus à l'instar des noyaux des colonnes dorsales, on y retrouve aussi et ce particulièrement dans la région dorsale (NVsnpr-D), des cellules ayant des projections glutaminergiques monosynaptiques dirigées vers le NVmot et plus précisément aux motoneurones de fermeture situés dans la région dorsolatérale (Li et coll., 1995 ; Yoshida et coll., 1998 ; Kolta, 2000 ; Yamamoto et coll., 2007). Les neurones du NVsnpr-V projettent au contraire, aux motoneurones innervant les muscles d'ouverture, dans la région ventromédiane du NVmot. De même, les efférences du NVsnpr-D atteignent aussi directement les différentes sous-divisions de la NVpéri, autrefois appelée Regio h et subdivisée en la région intertrigéminale (interV), supratrigéminale (supraV) et juxtatrigéminale (juxtaV), respectivement positionnées latéralement, dorsalement et

médialement au NVmot (Yoshida et coll., 1998 ; Westberg et coll., 1998 ; Kolta et coll., 2000 ; Bourque et Kolta 2001 ; Inoue et coll., 2002 ; Yamamoto et coll., 2007). Ces projections sont non-négligeables dans le contrôle de la mastication, puisque ces régions sont impliquées dans la modulation du patron masticatoire (Donga et coll., 1991 ; Turman et Chandler et coll., 1994 ; Tanaka et coll., 1999 ; Enomoto et coll., 2002 ; Tsuboi et coll., 2003).

3. *Le GPC masticatoire*

La rythmicité des mouvements masticatoires a d'abord été expliquée, en suggérant l'existence dans le tronc cérébral, de deux réflexes respectivement activés de façon alterne, lors de la fermeture et l'ouverture de la mâchoire, par une pression mécanique stimulant les afférences parodontales et l'étirement musculaire stimulant les afférences provenant des fuseaux neuromusculaires (Sherrington, 1917). Sans remettre en cause l'existence de ces réflexes, Magoun et coll. (1933) ont plutôt émis l'hypothèse voulant que le réseau neuronal minimal nécessaire à la génération du rythme masticatoire se trouve dans le tronc cérébral. C'est au début des années 1970, que cette hypothèse s'est vue confirmée par les travaux de Dellow et Lund (1971). Utilisant des lapins paralysés et décérébrés, dont les nerfs branchiaux, cervicaux et la moelle épinière étaient sectionnés, ils ont en effet montré que malgré ces lésions, des trains de stimulations de la voie corticobulbaire ou du putamen sont toujours aptes à induire des bouffées d'activité alternées dans les nerfs innervant les muscles antagonistes responsables de l'ouverture et de la fermeture de la mâchoire.

Introduction aux GPC

Un tel centre rythmique gouvernant un patron moteur correspond bien à la définition générale du concept de générateur de patrons centraux (GPC). De fait, les GPC sont des réseaux de neurones, majoritairement composés d'interneurones locaux, ayant la capacité, par leurs propriétés intrinsèques ou de connectivité, d'engendrer et de maintenir une activation et inhibition en alternance des motoneurones innervant les muscles antagonistes associés à un mouvement rythmique; et ce même lorsque isolés des commandes descendantes provenant des centres supérieurs et des afférences sensorielles acheminées depuis la périphérie (Lund, 1991 ; Nakamura et Katakura, 1995 ; Rossignol et Dubuc, 1994 ; Grillner, 2003 ; Feldman et Del Negro, 2006 ; Harris-Warrick, 2010, pour des revues). Ce principe d'organisation neuronale est retrouvé depuis les invertébrés jusqu'à l'homme et il n'est certainement pas unique à la mastication. Au contraire, les GPC sont à l'origine d'une grande variété de comportements moteurs rythmiques, dont la locomotion, la respiration et la déglutition.

L'architecture des réseaux neuronaux au coeur des GPC varie cependant en complexité selon les organismes et les comportements générés. Ce continuum de complexité progresse à partir de simples circuits dédiés générant une activité effectrice stéréotypée, jusqu'aux réseaux distribués et réorganisés codant pour l'ensemble des variantes d'un mouvement par la modification des propriétés des neurones impliqués ou le recrutement de différentes sous-populations de neurones (Westberg et coll., 1998 ; Grillner, 2003, une revue). En effet, le réseau de neurones formant un GPC ne doit pas être considéré comme un bloc homogène ou fixe de neurones mais plutôt comme un assemblage

dynamique de sous-unités. Ainsi chacune des structures associées à la mastication comme la langue, les muscles du visage et ceux associés au mouvement de la mâchoire, sont innervées par des pools de motoneurons respectivement activés par des GPC distincts, ou à tout le moins des sous-unités aptes à générer une activité motrice rythmique (Nakamura et Natakura, 1995 ; Nakamura et coll., 1999 ; Yamada et coll., 2005, pour des revues). De plus, la coordination bilatérale du mouvement résulte en réalité de l'expression coordonnée de l'activité de deux GPC, situés de part et d'autre de la ligne médiane, respectivement responsable de la génération de la sortie motrice du côté ipsilatéral, mais s'innervant mutuellement par des projections inhibitrices (Nozaki et coll., 1986; Chandler et Tal, 1986; Donga et coll., 1991; Tanaka et coll., 1999).

Enfin, de plus en plus de données expérimentales soutiennent l'idée selon laquelle le réseau de neurones formant un GPC devrait être conceptualisé comme l'association entre un générateur de rythme et un générateur de bouffées, respectivement responsable de la durée des cycles et du patron de la sortie motrice. Originellement formalisé dans le cadre de la respiration (Feldman et Ellenberg, 1988), ce modèle d'organisation trouve aussi sa place dans le cas de la mastication. Ainsi, il a été montré *in vivo*, chez le lapin, que le rythme et le patron masticatoire peuvent être indépendamment modulés par des stimulations corticales (Lund et coll., 1984 ; Scott et coll., 2001). De même, Westberg et coll. (1998) ont montré que, lors d'épisodes de mastication induits par la stimulation corticale, le réseau de prémotoneurons actifs et en phase avec la mastication est en constante réorganisation; certains neurones étant recrutés et d'autres rejetés du réseau en fonction du patron masticatoire évoqué.

3.1. *Un GPC localisé dans le tronc cérébral*

L'expérience de Dellow et Lund (1971) se révéla être un jalon important sur la voie visant à élucider la structure du réseau et les mécanismes responsables de la génération du mouvement masticatoire et plus de 15 ans ont été nécessaires pour voir apparaître un premier modèle incluant le potentiel de générateur de rythme de structure anatomiques précises et de leur interconnections. Nozaki et coll. (1986) ont en effet élaboré un premier modèle du GPC masticatoire, sur la base d'une série d'expériences réalisées chez le cochon d'inde combinant l'utilisation d'une variété d'agents pharmacologiques à la réalisation de nombreuses transections, à différents niveaux et dans les différents plans. Leur modèle et ses dérivés postulaient que l'activité tonique émanant de la partie postérieure de l'ACM, serait acheminée par la voie corticobulbaire, jusqu'à la formation réticulée médiane bulbaire, du côté contralatéral, où selon eux se situe le centre générateur de rythme associé à la mastication (voir Figure 5). Plus précisément, l'input cortical activerait les neurones de la région dorsale du noyau paragigantocellulaire (PGC), formant un relai monosynaptique excitateur vers les neurones de la partie rostrale du noyau gigantocellulaire (GCo), où il y aurait transduction de l'activité tonique entrante, en activité rythmique de même fréquence que la mastication fictive. L'activité rythmique serait elle-même relayée monosynaptiquement aux prémotoneurones dont l'activité sélectionnerait un patron masticatoire, formant par le fait même le générateur de bouffées, qui selon les auteurs, se trouverait au sein de la formation réticulée parvocellulaire bulbaire (PCRt) adjacente au noyau hypoglosse (NXII) et projetterait finalement aux motoneurones d'ouverture et de fermeture de la mâchoire (Nakamura et Katakura, 1995, pour une revue).

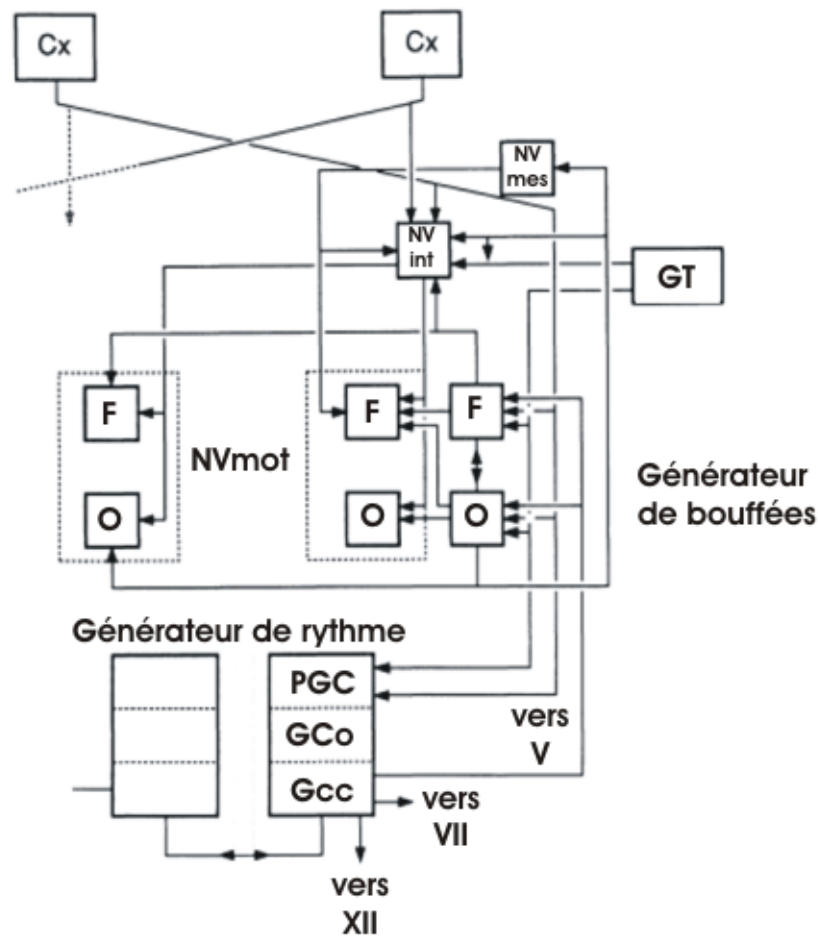


Figure 5. Modèle de GPC basé sur celui de Nozaki et coll. (1986). (Adapté de Lund et coll., 1991). Abréviations: Cx: Cortex; F: motoneurone de fermeture; GCo: région rostrale du noyau gigantocellulaire; Gcc: région caudale du noyau gigantocellulaire; GT: Ganglion trigéminal; NVint: Formation réticulée intertrigéminal; NVmes: noyau mésencéphalique du nerf trijumeau; NVmot: noyau moteur trigéminal; O: motoneurone d'ouverture; PGC: noyau paragigantocellulaire; V: nerf trijumeau; VII: nerf facial; XII: nerf hypoglosse.

D'autres observations, elles aussi réalisées suite à des transections de troncs cérébraux, ont cependant misent à mal ce modèle. En effet, Chandler et Tal (1986) ont d'abord montré que la mastication n'est pas affectée par une lésion rostrale à NXII, éliminant donc le dernier relais, dans la PCRT, du modèle de Nozaki et coll. Puis, il a été montré qu'une transection au niveau du noyau GC n'abolit pas l'activité rythmique au NVmot, éliminant donc le générateur de rythmes postulé par le modèle (Kogo et coll., 1996). Enfin, Tanaka et coll. (1999) ont circonscrit le réseau minimal nécessaire à la génération du rythme au niveau pontique, dans une région s'étendant sur 1 mm rostralement et caudalement au NVmot ; soit entre les limites rostrales des noyaux NVmot et NVII.

À l'intérieur du périmètre délimité par Tanaka et coll. (1999), on retrouve une portion du noyau pontis caudalis (nPontC), la région rostrale de la sous-section oralis du noyau trigéminal spinal (NVspo- γ), le noyau trigéminal sensoriel principal (NVsnpr), la formation réticulée parvocellulaire et les sous-divisions de la NVpéri. Ces régions présentent une activité en phase avec la mastication (Donga et coll., 1990 et 1991, Westberg et coll. 1998 et 2001) et une immunoréactivité à la protéine c-Fos, un marqueur fonctionnel d'activité, suite à des épisodes répétés de mastication fictive (Athanassiadis et coll., 2005a). Ces animaux étant alors paralysés, l'activité observée dans ces régions classiquement considérées comme ne formant qu'un relais sensoriel n'est pas le fruit d'une afférence sensorielle et témoigne donc bel et bien d'une activité générée au niveau central.

Bien que ces structures projettent aux NVmot des deux côtés de la ligne médiane et occupent une place importante dans la modulation du patron moteur (Kolta et coll., 2000), des travaux réalisés dans notre laboratoire ont néanmoins montré que la plupart de ces structures ne possèdent pas de cellules présentant de propriétés rythmogènes intrinsèques pour en faire des cellules « pacemaker » à l'origine du rythme masticatoire (Bourque et Kolta, 2001). Cette étude réalisée chez le rat *in vitro*, sur la préparation de tranche de tronc cérébral, a également montré qu'entre les limites rostrales des noyaux moteurs des nerfs facial et trigéminal, la région la plus propice à générer le rythme masticatoire se situerait dans la portion dorsale du noyau sensoriel principal du Trijumeau (NVsnpr-D) et que contrairement à l'hypothèse en vogue à ce moment-là, seul un faible pourcentage des interneurons de la formation réticulée médiane (noyau pontis caudalis (Npontc)) pouvait générer une activité rythmique intrinsèque.

Confirmant cette observation *in vivo*, Tsuboi et coll. (2003) ont noté une activité rythmique en phase avec les mouvements masticatoires, chez les neurones localisés principalement dans le tiers le plus dorsal du NVsnpr (voir Figure 6). Ils ont également noté que les neurones en phase avec l'ouverture et la fermeture de la mâchoire sont distribués de façon significativement différente au sein du NVsnpr-D; ceux associés à l'ouverture étant retrouvés tout au long l'axe rostro-caudal, alors que ceux associés à la fermeture étaient uniquement retrouvés dans le 1 mm le plus rostral du noyau. Sur la base de leurs résultats, ils ont enfin postulé que cette population de neurones constituerait ou à tout le moins participerait à la formation du cœur rythmique du GPC masticatoire.

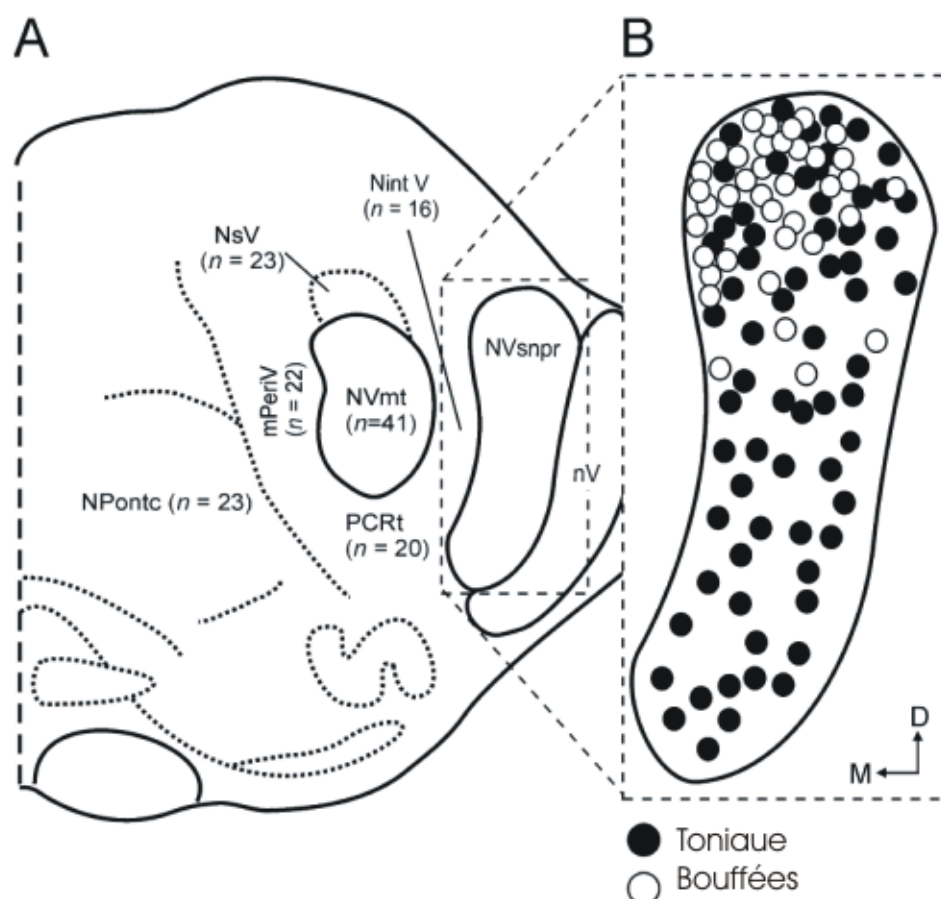


Figure 6. Distribution et patron d'activité des neurones du NVsnpr. **A**, Schéma d'une coupe transverse du tronc cérébral au niveau du noyau moteur trigéminal (NVmot) illustrant les sites et le nombre de microstimulations effectuées. **B**, Distribution spatiale des sous-types neuronaux du NVsnpr, classés selon le type de réponse observé (décharges en bouffées (blanc) ou toniques (noir)). (Adapté de Athanassiadis et coll., 2005b).

3.2. *Mécanisme générateur de rythme*

Une première contribution à l'élucidation des mécanismes à l'origine des bouffées de décharges au sein du NVsnpr-D est attribuable à Sandler et coll. (1998) ; ayant rapporté que, chez la gerbille, près de la moitié des neurones du NVsnpr-D possèdent une conductance sodique persistante (I_{NaP}), qui une fois activée génère de longs plateaux de potentiel permettant de soutenir des bouffées de décharges, et ce même lorsque isolés synaptiquement. Des travaux de notre laboratoire ont ensuite non seulement confirmé ces résultats chez le rat, mais aussi montré, que l'émergence de cette conductance et du patron de décharge en bouffées apparaissent de concert aux mouvements masticatoires chez le rat (Brocard et coll., 2006). Ces travaux ont aussi mis en évidence que l'activation d' I_{NaP} est potentialisée par la réduction de la $[Ca^{2+}]_e$. En effet, près de 80% des neurones déchargeant de façon tonique ou mixte (tonique et en bouffées) voient alors leur patron de décharge converti en bouffées rythmiques (Figure 7 A).

Les mécanismes précis expliquant comment la diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ induit l'activation d' I_{NaP} ne sont pas connus. Par contre, des bouffées de décharges synchrones et générées par une diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ sont observées depuis des décennies. C'est dans la région CA1 de l'hippocampe que ce type de bouffées a initialement été décrit. Si la très petite distance y séparant les corps cellulaires et les grandes fluctuations de $[Ca^{2+}]_e$ y étant enregistrées en font un lieu idéal pour les observer, il est cependant clair que de nombreuses structures peuvent les soutenir (Jefferys et Haas, 1982 ; Taylor et Dudek, 1982 ; Konnerth et coll., 1984 ; Bouskila et Dudek, 1993). Un des mécanismes possibles pour expliquer l'effet de la $[Ca^{2+}]_e$ sur I_{NaP} , découle du fait que les cations

divalents sont attirés à la membrane par le gradient électrochimique et créent un écran de charges fortement positives à la surface de la membrane. Il en résulte une différence de potentiel locale pouvant influencer celle perçue par les canaux membranaires sensibles au voltage et une modulation de l'excitabilité neuronale (Jefferys, 1995, pour une revue). Ceci ne peut cependant pas expliquer l'activation d' I_{NaP} par une diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ telle qu'observée par Su et coll. (2001), au niveau de l'hippocampe ou Brocard et coll. (2006), au sein du NVsnpr-D, puisque dans les deux cas le calcium y était remplacé par une quantité équimolaire de magnésium. Su et coll. (2001) suggèrent donc que le calcium se lierait spécifiquement au canal responsable de la conductance I_{NaP} .

L'effet de la diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ pourrait également passer par la modulation d'autres conductances que I_{NaP} ; induire une dépolarisation, puis l'activation d' I_{NaP} et mener à la génération de bouffées de décharges. Brocard et coll. (2006) ont donc montré que la génération de bouffées n'est pas due à la diminution de l'hyperpolarization suivant le potentiel d'action liée à l'absence d'activation des I_{KCa} de grande ou de petite conductance. Ils ont en effet montré que les antagonistes spécifiques de ces conductances, soit l'apamine et la charybdotoxine, ne pouvaient induire de bouffées, chez des neurones présentant pourtant la capacité à décharger en bouffées, lorsqu'exposés à un ACSF sans calcium. De même, il serait surprenant qu'un courant calcique entrant soit essentiel à l'initiation des bouffées de décharges observées, puisqu'elles sont amplifiées par l'élimination du calcium extracellulaire.

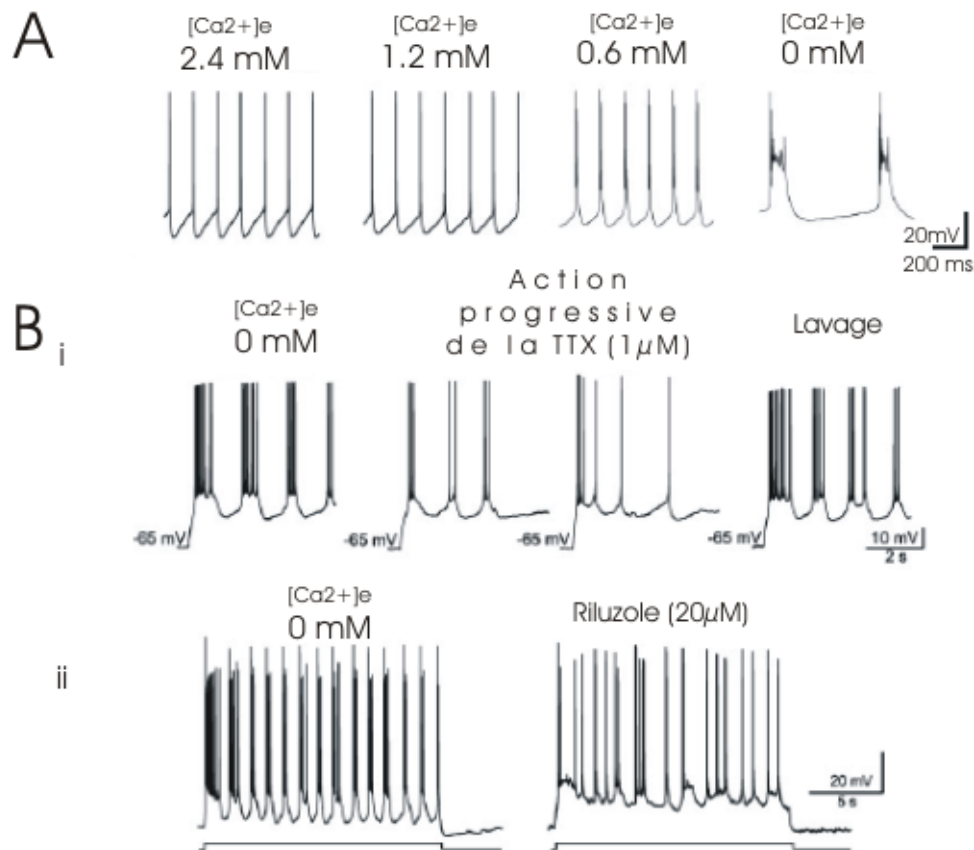


Figure 7. Propriétés de décharges intrinsèques des neurones du NVsnpr. A, Modification du patron de décharge en fonction de la [Ca²⁺]_e. B, Implication de la conductance sodique persistante (I_{Nap}) dans la capacité intrinsèque de décharge en bouffées rythmiques des neurones du NVsnpr, tel que démontré par l'application locale de TTX (1 μM) (i) ou de l'antagoniste riluzole (ii) (Adapté de Brocard et coll., 2006).

Cependant, il est intéressant de noter que la révélation immunohistochimique de l'expression du canal Cav_{1,3} dans le NVsnpr, met en lumière sa présence chez l'ensemble des neurones du noyau, mais aussi que le marquage est particulièrement plus intense chez une sous-population de neurone de la région dorsomédiane du noyau (Sukiasyan et coll., 2009). Au contraire, la génération de bouffées en absence de calcium extracellulaire est bien abolie par l'application de riluzole (20 μ M) ou une faible exposition à la tétrodotoxine (TTX, à 1 μ M sur 5 à 10 min) (Figure 7 B).

La représentativité physiologique de ce phénomène est soutenue par de nombreuses études démontrant la diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ lors d'épisodes intenses d'activité neuronale (Heinemann et coll., 1977; Nicholson et coll., 1978 ; Benninger et coll., 1980; Nicholson, 1980; Somjen, 1980 ; Murase et Randic, 1983 ; Sykova 1997 ; Rusakov et Fine, 2003) ou à l'application d'acides aminés excitateurs (Pumain et Heinemann, 1985; Lücke et coll., 1995). De plus, une récente étude de notre laboratoire montre que la stimulation du tractus sensoriel trigéminal en condition physiologique de calcium extracellulaire induit une augmentation de la prévalence des neurones déchargeant en bouffées, une augmentation de la durée ou de la fréquence des bouffées, une synchronisation de l'activité des neurones du NVsnpr-D et une conversion à un mode de décharge rythmique des neurones déchargeant de façon tonique (Bernier et coll., 2010).

4. Hypothèse de travail

Nous proposons qu'une population de neurones du NVsnpr-D forme le cœur rythmique du GPC masticatoire. La stimulation prolongée des afférences périphériques et cortico-fugales arrivant au NVsnpr-D lors de l'initiation de la mastication induirait une diminution locale de la $[Ca^{2+}]_e$. L'augmentation progressive de la stimulation dépolariserait les neurones dans la plage d'activation d' I_{NaP} produisant un patron de décharge en bouffées, dont la fréquence augmenterait avec la dépolarisation; permettant ainsi la modulation du patron masticatoire. Cette étude fait partie d'un projet plus large dans lequel nous investiguons la possibilité que les astrocytes soient en partie responsables de la chute de la $[Ca^{2+}]_e$.

5. Les cellules gliales dans le système nerveux central

Ubiquitaires dans le système nerveux, les cellules gliales y forment le groupe cellulaire majoritaire, mais plusieurs types cellulaires, aux morphologies et aux fonctions distinctes, sont désignés par cette appellation. Le terme « glie » est hérité des travaux du neuropathologiste Rudolf Virchow (1856), mais c'est principalement grâce aux contributions de Deiters (1865), Golgi (1885 - 1886), Andriezen (1893), Cajal (1909; 1913), del Rio-Hortega (1920) et Penfield (1924), à l'avancement des techniques de marquage et à la découverte d'une kyrielle de morphologies cellulaires différentes regroupées sous le vocable de « glie », qu'une première nomenclature s'est développée autour des sous-types de cellules gliales (Somjen, 1988, pour une revue). Les données recueillies, au cours des quinze dernières années, mettant à profit les dernières

techniques électrophysiologiques, d'imagerie et les outils moléculaires et génétiques ont permis de faire évoluer cette nomenclature.

On reconnaît aujourd'hui principalement quatre types cellulaires gliaux, au sein du SNC des mammifères adultes : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules NG2 et les microglies; les trois premiers types étant souvent regroupés sous l'étiquette de « macroglies ». On retrouve aussi des macroglies au niveau du SNP, et même si elles diffèrent de celles présentes dans le SNC par leur nature, elles remplissent tout de même des fonctions analogues et offrent ainsi un modèle fort intéressant, à la jonction neuromusculaire, pour étudier la contribution des cellules gliales physiologie synaptique (Auld et Robitaille, 2003, une revue). Certaines différences sont également observées entre les différentes régions du SNC. Ainsi, il existe non seulement des variations, pour un même type de cellules gliales, selon les régions dont elles proviennent, mais certaines régions du SNC possèdent aussi des types de cellules gliales endémiques, dont les cellules de Muller et de Bergmann, respectivement retrouvées au niveau de la rétine et du cervelet (Grosche et coll., 1999 ; Kimelberg, 2004 ; Wang et Bordey, 2008). Cahoy et coll., (2008) ont réalisé une classification des macroglies selon la ressemblance des patrons de gènes en fonction du développement et comparativement à celui des neurones (Figure 8). Enfin, de nombreuses différences sont observées entre les espèces. Chez les reptiles, on retrouve surtout des névroglies radiaires peu différenciées, tandis que les cellules gliales présentes chez les primates ont développé une complexité et une diversité de morphologies bien supérieure à celle retrouvée chez les rongeurs (Kimelberg, 2004; Oberheim et coll., 2006 et 2009, pour des revues).

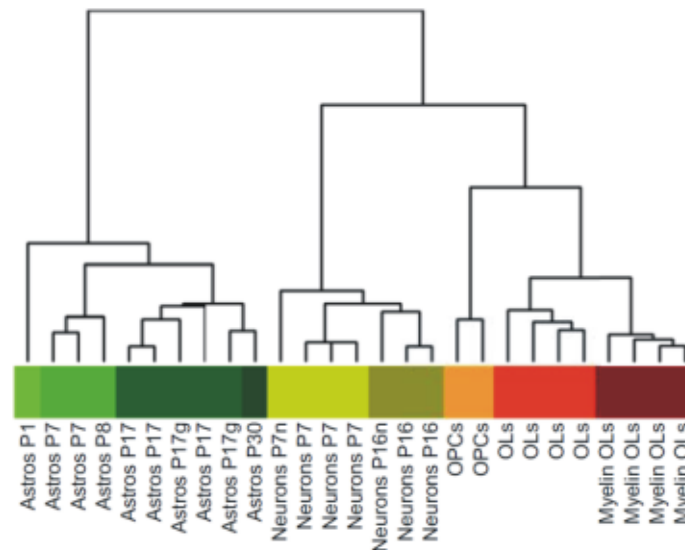


Figure 8. Dendrogramme illustrant la diversité des types cellulaires du SNC, classés selon la ressemblance des patron de gènes exprimés. Les couleurs représentent les lignées cellulaires observées (astrocyte - vert, neurones - jaune, oligodendrocytes - rouge) et les variations d'intensité des couleurs témoignent du degré de maturité des cellules analysées. Il est intéressant de noter que malgré l'étiquette commune de cellules gliales, les cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPC) et les oligodendrocytes post-mytotiques (OL) ressemblent davantage aux neurones qu'aux astrocytes, en termes des gènes exprimés. (Adapté de Cahoy et coll., 2008)

5.1. *Les Microglies*

La microglie est le seul type cellulaire du tissu nerveux tirant son origine du mésoderme et le seul type de cellule gliale retrouvé à la fois dans les systèmes nerveux central et périphérique. Sa fonction est immunitaire ; elle agit en tant que principal macrophage du système nerveux et son activation, lors d'inflammation ou en présence d'antigènes, mène à la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et de cytokines telles l'interleukine-1 β (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) (Retamal et coll., 2007).

5.2. *Les Oligodendrocytes*

Les oligodendrocytes sont responsables de la myélinisation. Ils possèdent un corps cellulaire sphérique faisant entre 10 et 15 μm de diamètre et de longs prolongements qui s'étendent de façon parallèle, jusqu'aux axones des neurones du SNC, qu'ils entourent et isolent (Chvátal et coll., 1995). L'accumulation des couches lipidiques crée des manchons de myéline, accélérant la transmission de l'influx nerveux en induisant une conduction saltatoire aux nœuds de Ranvier. Contrairement aux cellules de Schwann, leurs homologues du SNP, chaque oligodendrocyte est apte à émettre des prolongements en direction de plusieurs neurones.

5.3. *Les Cellules NG2⁺*

Les cellules NG2 (ou selon les publications : cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPC), synantocytes, polyendrocytes ou glies complexes) rassemblent les cellules exprimant le protéoglycane de sulfate de chondroïtine NG2 (ou AN2, chez la souris). Elles sont considérées comme des cellules progénitrices multi-potentes, à l'origine d'oligodendrocytes, mais aussi d'astrocytes et même de neurones, chez l'adulte (Butt et coll., 2005; Wigley et coll., 2007, pour des revues). Elles représentent en effet 95% des cellules en mitose, dans le SNC de souris adulte, à l'extérieur de la zone sous-ventriculaire (Ge et coll., 2009). De nombreuses études ont cependant aussi montré qu'une sous-population de cellules NG2 persistant chez l'adulte reçoit des contacts synaptiques glutaminergiques et GABAergiques (Bergles et coll., 2000; Lin et Bergles, 2004; Jabs et coll., 2005; Hamilton et coll., 2009) persistant pendant et après la division cellulaire (Ge et coll., 2009) et que ces cellules possèdent les récepteurs pour de nombreux neurotransmetteurs et gliotransmetteurs tels AMPA, GABA_A et P2Y₁. De plus, Hamilton et coll. (2009) suggèrent la présence, chez ces cellules, d'un mécanisme de libération vésiculaire dépendant de la synaptophysine, leur permettant de répondre à l'information synaptique qui leur parvient.

Parmi les points communs reconnus aux cellules NG2, retenons qu'elles ne présentent pas de couplage intercellulaire par l'entremise de jonction Gap, mais qu'elles sont aptes à générer des réponses calciques typiques des astrocytes, suite à une application d'ATP ou suivant une stimulation mécanique. De plus, elles possèdent des récepteurs glutaminergiques de type AMPA, perméables au calcium, des canaux potassiques

sensibles au potentiel et génèrent un courant rectifiant sortant (Butt et coll. 2005; Wigley et coll., 2007; Bakiri et coll., 2009, pour des revues). Il est cependant évident, que les propriétés des cellules NG2 varient énormément en fonction de leur origine; Ge et coll. (2009) ayant même rapporté la génération de potentiels d'actions chez une sous-population des cellules NG2 provenant du cortex visuel de souris adulte.

Il convient de s'intéresser davantage aux cellules NG2, dans l'optique où ces cellules représentent un phénotype cellulaire partageant de nombreuses propriétés avec les cellules de la sous-population d'astrocytes de type rectifiants ou GluR. Si bien que de nombreux auteurs en sont venus à suggérer qu'une seule et même population de cellule pourrait être à l'origine des deux groupes ou à tout le moins, que les cellules de type GluR formeraient une sous-population des cellules NG2 persistantes chez l'adulte (Matthias et coll., 2003; Grass et coll., 2004; Wallraff et coll., 2004; Jabs et coll., 2005; Szoke et coll., 2006; Zhou et coll., 2006; Serrano et coll., 2008). De plus, si le gène de la GFAP est bel et bien transcrit chez ces cellules, le marquage immunohistochimique de la GFAP reste quant à lui, relativement faible par rapport aux astrocytes de la sous-population GluT électrophysiologiquement passive (Zhou et Kimelberg, 2000). Cela pourrait expliquer certains résultats contradictoires d'études se penchant sur les différents types d'astrocytes et utilisant des souris transgéniques dont l'expression d'une protéine fluorescente est liée à l'activité du promoteur de la GFAP (Schools et coll., 2003).

5.4. *Les astrocytes*

Les astrocytes représentent le type cellulaire le plus nombreux du SNC. Ces cellules ont un corps cellulaire dont le diamètre fait entre 7 à 9 μm et d'où irradiant au moins 4 prolongements principaux leur conférant l'aspect étoilé, d'où les astrocytes tirent leur nom. Cependant, la visualisation des nombreuses ramifications bifurquant à partir des prolongements principaux révèle plutôt un aspect spongieux (Bushong et coll., 2002, voir Figure 9 A). L'ensemble formé du corps cellulaire et des prolongements qui en émergent correspond au « domaine » d'un astrocyte. Dans le tissu nerveux, les astrocytes sont organisés de telle sorte que ces domaines astrocytaires sont apposés les uns contre les autres avec un minimum de chevauchement (Bushong et coll., 2002; Ogata et Kosaka, 2002; Halassa et coll., 2007, voir Figure 9 B). Wigley et coll. (2007) font cependant remarqués, que s'il y a peu de chevauchement entre les domaines astrocytaires, ceux des cellules NG2 les chevauchent complètement et pourraient même être en mesure d'assurer une connectivité entre les domaines astrocytaires. Les domaines astrocytaires varient en taille selon les régions du SNC et les espèces. Ainsi du cortex à l'hippocampe des rongeurs, le volume passe d'environ 22 000 μm^3 à 66 000 μm^3 et ces chiffres sont 16,5 fois plus élevés pour les astrocytes humains. En se basant sur une densité de synapses relativement constante entre les deux espèces, Oberheim et coll. (2009) calculent ainsi entre 20 000 et 120 000 synapses par astrocytes chez les rongeurs alors qu'ils en comptent entre 270 000 et 2 millions, chez l'homme. Le domaine astrocytaire n'est cependant pas une unité fonctionnelle uniforme. En effet, lorsqu'observé en microscopie électronique, le domaine astrocytaire révèle une nature

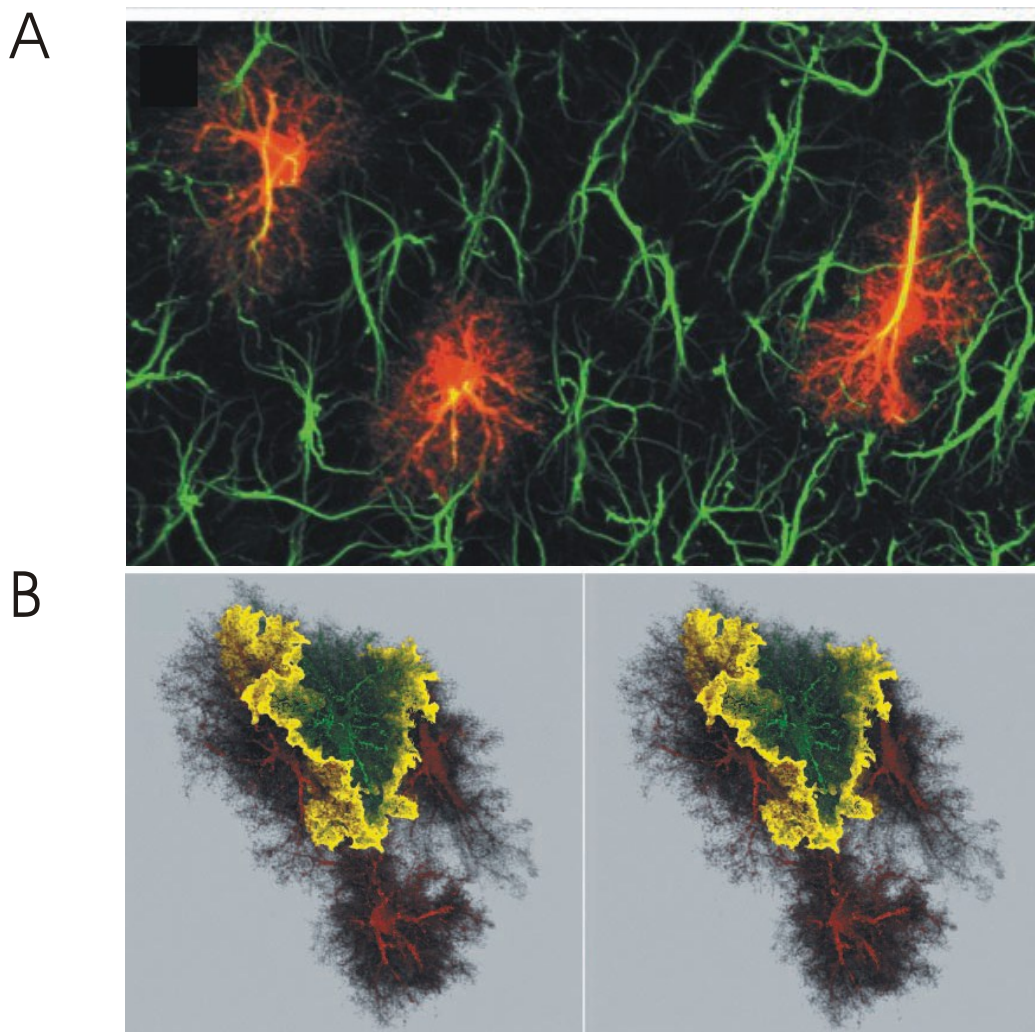


Figure 9. Morphologie et domaine astrocytaire. **A**, superposition des plan focaux, sur $25\ \mu\text{m}$, de la couche CA1 de la statum radiatum de l'hippoampe. Les filament intermédiaire principaux formés de GFAP (vert) évoquent les étoiles d'où les astrocytes tirent leur nom, mais la dialyse d'un marqueur fluorescent dans le cytoplasme (en rouge) laisse plutôt entrevoir la nature spongiforme des prolongements astrocytaires. **B**, Pair d'images stéréographiques de la reconstruction 3D de la surface d'interactions entre les domaines astrocytaires (jaune) démontrant qu'ils sont apposés les uns contre les autres et qu'ils sont peu ou pas interdigitalisés. (Adapté de Bushong et coll., 2002).

compartimentalisée en microdomaine, permettant de limiter l'influence de la réponse gliale à un groupe plus restreint de synapses (Grosche et coll., 1999).

Faute de mieux, en plus de la morphologie, les astrocytes sont essentiellement identifiés visuellement par le marquage de protéines principalement exprimées par les astrocytes. Le marqueur principalement utilisé est la GFAP (« glial fibrillary acidic protein »). Chez le rat, entre la deuxième et la troisième semaine suivant la naissance, cette protéine s'ajoute et remplace la vimentine dans la fabrication des filaments intermédiaires du cytosquelette des astrocytes matures (Dahl, 1981). Les prolongements fins des astrocytes ne peuvent donc pas être observés par marquage immunohistochimique de la GFAP, puisque seul le cytosquelette du soma et des prolongements principaux est pourvu de ces filaments. Ce problème peut être contourné par l'utilisation de fluorophores pouvant être introduits dans la cellule et diffuser dans le cytoplasme lors d'un enregistrement en patch-clamp ou par leur expression, utilisant la GFAP comme gène rapporteur, mais comme vu précédemment cette technique engendre à son tour un problème de spécificité (Zhou et Kimelberg, 2000). De plus, les cellules caractérisées comme étant des astrocytes, sur la base de leur morphologie, n'expriment pas toutes la GFAP (Simard et coll., 2003; Nimmerjha et coll., 2004) ; la GFAP étant principalement exprimée par les astrocytes présents dans la matière blanche (Bushong et coll., 2002) et particulièrement peu présente chez les astrocytes du cortex (Houades et coll., 2008). D'autres marqueurs peuvent aussi être utilisés afin de préciser l'identification des astrocytes. Tel est le cas du S100 β , une petite protéine chélatrice du calcium exprimée et sécrétée par certains astrocytes. Mais comme pour la GFAP, il a été montré que l'expression de la eGFP en

fonction de l'activité du promoteur de S100 β , marque de nombreux autres types cellulaires (Vives et coll., 2003 ; Cahoy et coll., 2008). L'expression de l'aquaporine-4 est quant à elle propre aux astrocytes, mais son marquage ne révèle que les prolongements astrocytaires entourant les vaisseaux sanguins (Cahoy et coll., 2008). Enfin, il est possible de distinguer les astrocytes par leur absorption préférentielle de certaines molécules, comme le marqueur fluorescent sulforhodamine-101 (Nimmerjahn et coll., 2004 ; Kafitz et coll., 2008 ; Takata et Hirase, 2008) ou l'indicateur calcique Fluo4-AM (Serrano et coll., 2008).

Les fonctions aujourd'hui associées aux astrocytes sont nombreuses, mais jusqu'à récemment, la vision classique, quant à leur contribution au sein du système nerveux, ne leur reconnaissait qu'une implication dans des mécanismes de supports trophiques. Ils se révèlent, en effet, indispensables à l'homéostasie du tissu nerveux (Iadecola et Nedergaard, 2007; Theodosis et coll., 2008; Wang et Bordey, 2008, pour des revues). Ils sont non seulement impliqués dans le maintien de la matrice extracellulaire, de la barrière hémato-encéphalique et du contrôle de la microcirculation (Simard et coll., 2003; Zonta et coll., 2003; Iadecola et Nedergaard, 2007; Schummers et coll., 2008), mais remplissent de plus des fonctions immunitaires innées en condition pathologique; agissant par exemple, en tant que macrophage et cellules présentatrices d'antigènes, tout en étant à l'origine de la cicatrice gliale, visant à isoler le tissu nerveux affecté (Wang et Bordey, 2008, pour une revue). Enfin, ils participent aussi à l'initiation de la synaptogenèse (Pfrieger et Barres, 1997; Beattie et coll., 2002; Christopherson et coll., 2005), à l'isolation des synapses (Bergles et coll., 1999; Danbolt, 2001), à

l'homéostasie des concentrations des ions extracellulaires (Amzica et coll., 2002; Lian et Stringer, 2004; Wallraff et coll., 2006; Stringer et coll., 2007; Zhou et coll., 2009) et à la recapture des neurotransmetteurs (Danbolt, 2001; Szoke et coll., 2006), en plus de former une niche potentielle de cellules souches neurales (Reynolds et Weiss, 1992).

Ce paradigme a cependant changé, au début des années 1990, grâce aux travaux Cornell-Bell et coll. (1990) et Charles et coll. (1991), montrant que les astrocytes sont des cellules excitables, aptes à transmettre une information sur de longues distances. À la différence des neurones, cette excitabilité n'est cependant pas exprimée par une différence de potentiel membranaire, mais plutôt par une hausse transitoire de la concentration intracellulaire de calcium se produisant de façon spontanée ou en réponse à l'activité neuronale. Ces observations réalisées *in vitro*, en culture, ont depuis été corroborées à de nombreuses reprises par des études réalisées tant en tranches qu'*in vivo* (Hirase et coll., 2004; Wang et coll., 2006; Dombeck et coll., 2007; Schummers et coll., 2008; Takata et Hirase, 2008 ; Kuchibhotla et coll., 2009). De plus, au cours des dix dernières années, une somme importante de données montrant que la communication entre neurones et astrocytes est bidirectionnelle a permis l'émergence du concept de synapse tripartite (Araque et coll., 1999). Dans cette nouvelle vision de l'unité fonctionnelle régissant le traitement de l'information, la glie s'ajoute aux éléments neuronaux pré et postsynaptiques, participe de façon active et ne se contente pas de répondre à l'activité neuronale, mais peut l'influencer à son tour; notamment par la sécrétion de « gliotransmetteurs », tel le glutamate, l'ATP, la D-serine et le S100- β (Pfrieger et Barres, 1997; Araque et coll., 1999; Haydon, 2001; Nashiyama et coll., 2002;

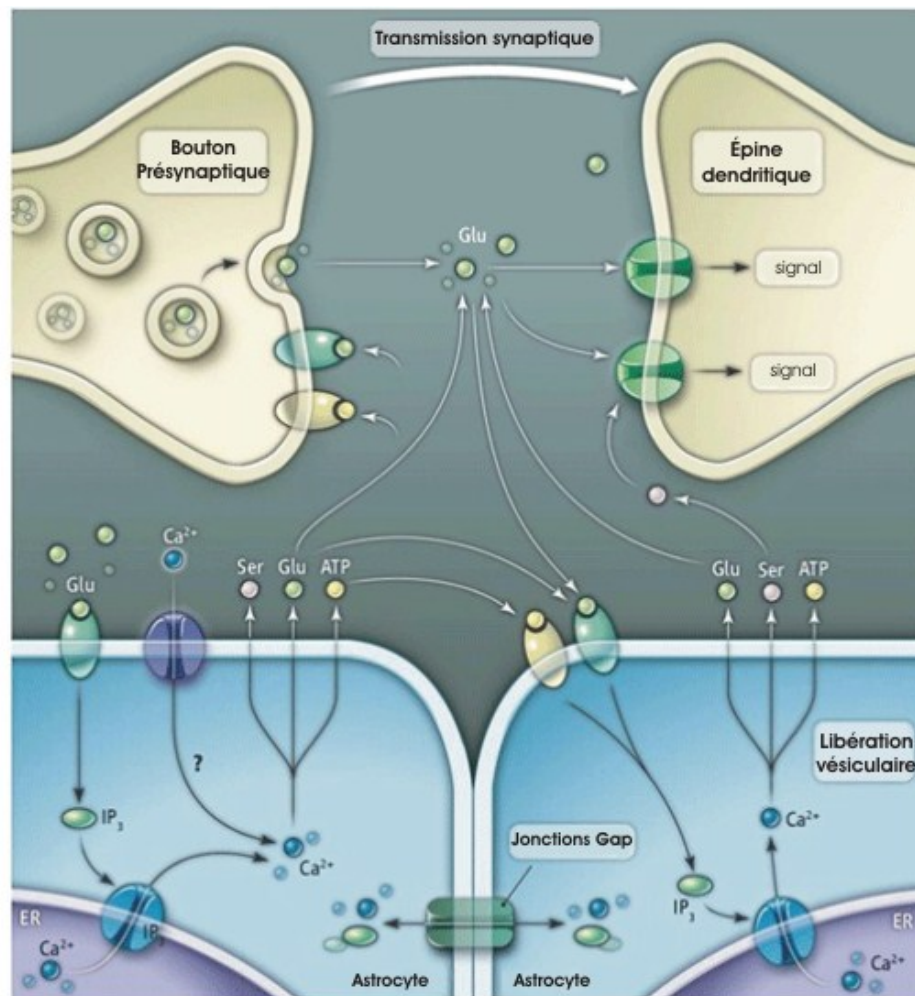


Figure 10. Diagramme illustrant le concept de synapse tripartite. Les astrocytes répondent à la libération de nombreux neurotransmetteurs, dont le glutamate (Glu), par l'activation de récepteurs métabotropiques induisant la génération d'IP₃ et une hausse transitoire de la concentration calcique intracellulaire ([Ca²⁺]_i). Le calcium intracellulaire provient du réticulum endoplasmique (ER), par la liaison de l'IP₃, d'un influx de calcium extracellulaire par un mécanisme qui n'est toujours pas complètement élucidé et enfin par la propagation de l'activité calcique au sein du syncytium astrocytaire. Cette hausse de la [Ca²⁺]_i provoque le relargage de gliotransmetteurs tels le glutamate, l'ATP et la D-Sérine (Ser), par leur libération vésiculaire ou suivant l'ouverture d'hémicannaux. L'activité calcique peut être transmise entre astrocytes à la fois par les jonctions gap que par la liaison de l'ATP à ses récepteurs de la membrane astrocytaire. La modulation de la transmission synaptique par les gliotransmetteurs est causée par leur liaison aux récepteurs situés tant du côté présynaptique, que postsynaptique. (Adapté de Kirchhoff, 2010)

Auld et Robitaille, 2003; Pascual et coll., 2005; Perea et Araque, 2005 et 2006; Agulhon et coll., 2008; Fellin, 2009 ; voir Figure 10).

5.4.1. Les astrocytes forment une population cellulaire non homogène

L'étude des astrocytes quant à leurs propriétés et leur contribution à la physiologie synaptique est cependant complexifiée par le fait que les astrocytes ne forment décidément pas un groupe cellulaire homogène (Cahoy et coll., 2008; Yeh et coll., 2009). Andrienzen (1893) a d'ailleurs fait, dès la fin du dix-neuvième siècle, la distinction entre les astrocytes provenant de la matière blanche et de la matière grise; respectivement alors identifiés comme astrocytes fibreux et protoplasmiques. Si cette première classification est toujours présente dans la littérature (Bushong et coll., 2002; Szoke et coll., 2006; Theodosis et coll., 2008; Oberheim et coll., 2009), elle est maintenant cependant considérée comme caduque par certains (Wang et Bordey, 2008) ; en raison de la grande diversité de morphologies et d'immunophénotypes cellulaires observés chez les astrocytes. En effet, de nombreuses études ont depuis suggéré une hétérogénéité des astrocytes en fonction de leur région d'origine dans le SNC, et ce, à toutes les échelles observées. Il a notamment été montré, que l'activation d'un même récepteur de l'ATP (P2X7) ne mène pas à la même réponse physiologique, chez les astrocytes de l'hippocampe et du cortex (Bianco et coll., 2009), que le couplage astrocytaire n'est pas limité par les mêmes contraintes dans le cortex visuel et le cortex somatosensoriel en barillet (Houades et coll., 2008) et que les astrocytes logés dans différentes couches corticales diffèrent par la dynamique de leurs réponses calciques

(Takata et Hirase, 2008). Enfin, l'analyse du transcriptôme astrocytaire, dans différentes régions du SNC (Yeh et coll., 2009) et à différents stades de développement (Cahoy et coll., 2008), a définitivement levé le voile sur la pluralité des phénotypes astrocytaires observés *in vitro* et *in vivo*, de telle sorte que l'attribution d'étiquettes permettant la classification des astrocytes en populations distinctes devient pour le moins ardue ou arbitraire.

Les astrocytes restent néanmoins usuellement discriminés en deux ou trois sous-populations, selon les régions du SNC, les auteurs et les outils utilisés (Walz, 2000; Kimelberg, 2004; Wang et Bordey, 2008; pour des revues). Au sein de l'hippocampe, les travaux de Zhou et Kimelberg (2001) et Matthias et coll. (2003) ont été parmi les premiers permettant d'y soutenir la coexistence de plusieurs sous types d'astrocytes, sur la base de propriétés électrophysiologiques et d'une expression différentielle de protéines membranaires. La terminologie distinguant les astrocytes en types GluT ou GluR dérive de ces travaux et décrit respectivement les cellules exprimant exclusivement les transporteurs (GLAST et GLT-1) du glutamate ou son récepteur ionotropique de type AMPA (Figure 11). De même, ces sous-populations sont aussi associées à des patrons électrophysiologiques distincts.

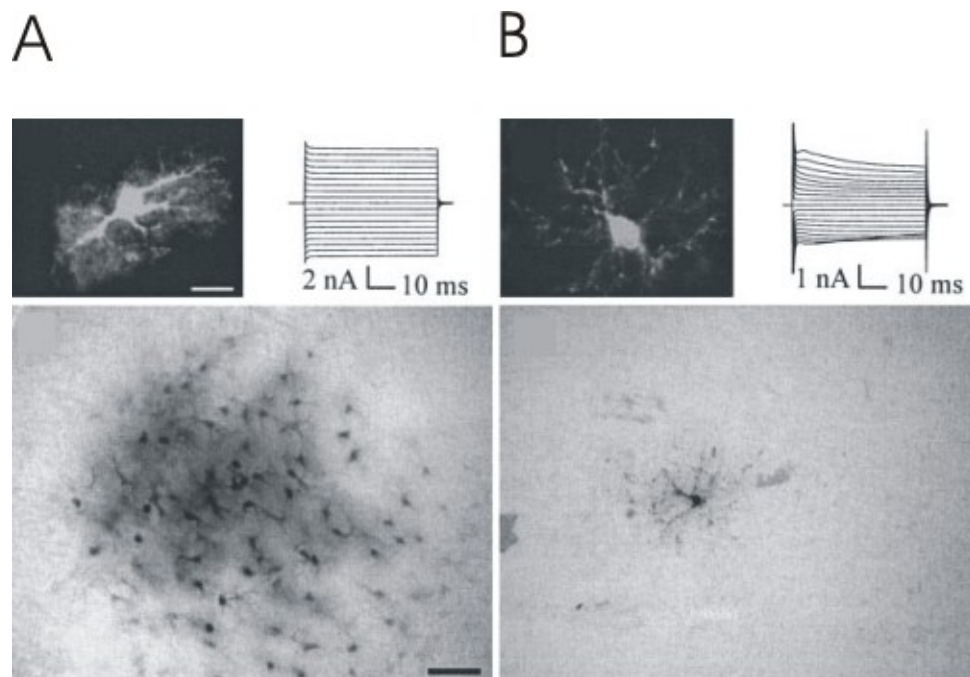


Figure 11. Diversité des sous-types d'astrocytes. L'expression des transporteurs glutaminergiques et des récepteurs ionotropiques AMPA permettent de distinguer les astrocytes en deux groupes (respectivement GluT en **A** et GluR en **B**). Ces distinctions se reflètent tant sur la morphologie (i), la relation courant-voltage (ii) et l'intensité du couplage interastrocytaire (iii). (Adapté de Wallraff et coll., 2004).

5.4.2. *Les cellules GluT*

Les cellules GluT, aussi qualifiées de glies passives, linéaires ou ohmiques, correspondent aux cellules auxquelles on fait classiquement référence lorsque l'on parle d'astrocytes (Matthias et coll., 2003). Les cellules GluT se distinguent morphologiquement des cellules GluR, par la forme ovoïde de leur corps cellulaire (Wallraff et coll., 2004) et par le fait qu'une partie de leurs prolongements que l'on nomme le pied astrocytaire s'étend jusqu'aux artérioles où il participe à la formation de la barrière hémato-encéphalique et au contrôle hémodynamique (Simard et coll., 2003; Iadecola et Nedergaard, 2007).

L'expression des transporteurs glutaminergiques GLT-1 et GLAST est à l'origine de la dénomination GluT de ces cellules. C'est l'expression de ces transporteurs qui supporte la capacité des cellules GluT à tamponner la concentration du glutamate dans le milieu extracellulaire (Danbolt, 2001; Zhou et Kimelberg, 2001; Matthias et coll., 2003; Wallraff et coll., 2004). De même, l'expression du transporteur glycinergique GlyT1 et la fonction d'homéostasie de la concentration glycinergique extracellulaire se limitent aux cellules de type GluT (Szoke et coll., 2006).

Outre une absence de potentiel d'action, la signature électrophysiologique caractéristique des cellules GluT est une relation courant-voltage (I-V) linéaire. Elle provient d'une absence de canaux sodiques voltage dépendants et de la présence de canaux potassiques rectifiants présentant une proportion symétrique de rectification entrante et sortante, leur conférant une grande conductance potassique insensible au

temps et au potentiel membranaire (Wallraff et coll., 2006 ; Wang et Bordey, 2008). Les principaux candidats suggérés afin d'en expliquer l'origine sont les canaux potassiques à rectification entrante de type 4.1 (Kir_{4.1}) (Higashi et coll., 2001 ; Djukic et coll., 2007) et les canaux potassiques à deux pores (Zhou et coll., 2009), particulièrement les isoformes TWIK-1 et TREK-1.

La grande conductance des astrocytes GluT pour le potassium explique aussi pourquoi leur potentiel membranaire est si hyperpolarisé; sa valeur se rapprochant du potentiel d'équilibre du potassium (Bordey et Sontheimer, 2000 ; Wallraff et coll., 2006). Ces conductances confèrent aussi aux cellules GluT la capacité de récupérer le potassium extracellulaire libéré par l'activité neuronale (Xiong et Stringer, 1999; Amzica et coll., 2002; Wallraff et coll., 2006; Djukic et coll., 2007; Zhou et coll., 2009). Kuffler et Nicholls (1966) ont proposé l'hypothèse du tamponnage spatial, stipulant que le potassium ainsi capté diffuse dans le syncytium astrocytaire pour être relâché dans une région où sa concentration est inférieure ou directement dans la circulation sanguine (Djukic et coll., 2007). De plus, il a été montré à l'aide de souris transgéniques n'exprimant pas les connexines Cx43 et Cx30, que si l'établissement du syncytium astrocytaire n'est pas essentiel à la capacité des astrocytes à réguler la concentration extracellulaire du potassium, elle est cependant grandement facilitée par la présence du couplage (Wallraff et coll., 2006).

La formation de jonctions Gap intercellulaires et l'émergence de vastes syncytia incluant plusieurs dizaines de cellules est une caractéristique emblématique des astrocytes, mais elle est de plus généralement reconnue comme étant unique aux cellules GluT (Wallraff

et coll., 2004; Houades et coll., 2006 et 2008; Schools et coll., 2006; Serrano et coll., 2008).

5.4.3. Les Cellules GluR

Les cellules GluR sont, elles aussi, retrouvées dans la littérature sous de nombreuses appellations; cellules complexes ou astrocytes à rectifications sortantes étant les principales. Cette appellation GluR tire son origine du fait que, contrairement aux cellules GluT, ces cellules expriment le récepteur glutaminergique AMPA. Morphologiquement, elles sont caractérisées par un soma davantage sphérique que celui des cellules GluT et par le fait que les prolongements qui en émergent sont très fins et portent de petits nodules (Matthias et coll., 2003; Lin et Bergles, 2004; Wallraff et coll., 2004; Jabs et coll., 2005). Il semble néanmoins difficile, sinon impossible de distinguer les cellules GluR et GluT simplement sur la base d'une optique de Normaski (DIC) (Schools et coll., 2003).

D'un point de vue électrophysiologique, les cellules complexes sont généralement caractérisées par de forts courants sortants, dépendant du temps et du potentiel et leur conférant une relation I-V non linéaire. De plus, la résistance d'entrée des cellules rectifiantes est typiquement au-dessus de 300 M Ω et donc bien supérieure à celle des cellules passives. Enfin, il est généralement reconnu que les cellules complexes aient un potentiel membranaire de repos plus dépolarisé que celui des cellules passives, malgré que certains n'aient pas observé de différences (Wallraff et coll., 2004) ou, au contraire,

observé des cellules complexes davantage hyperpolarisées (Adermark et coll., 2008). Les valeurs moyennes observées dans la littérature varient considérablement et oscillent entre $-54,5 \pm 13,9$ mV (Szoke et coll., 2006) et -78 ± 5 mV (Houades et coll., 2008).

Le couplage intercellulaire et la formation de syncytium sont une autre différence critique entre les cellules GluT et GluR; les cellules complexes étant reconnues ne pas former de syncytium, mais sur ce point aussi, la littérature comporte son lot de contradictions et d'ambiguïtés. Ainsi, Wallraff et coll. (2004) ont montré que les cellules à rectification sortante n'expriment pas la connexine principale (Cx43) à l'origine des jonctions gap, chez les astrocytes, alors que Schools et coll. (2006), plus nuancés, ont observé que si le couplage intercellulaire est effectivement significativement plus important, chez les cellules passives, il est toutefois présent chez plus de 60% des cellules à rectifications sortantes.

Les cellules complexes sont régulées au cours du développement et chez l'adulte. Si la proportion qu'elles représentent parmi les astrocytes observés varie entre les études, toutes celles s'intéressant à l'implication du développement sur la présence des cellules complexes montrent néanmoins qu'elle diminue avec l'âge (Schools et coll., 2006; Zhou et coll., 2006; Houades et coll., 2008).

5.4.4. Astrocytes à rectification variable

Contrairement aux résultats observés par Matthias et coll. (2003), certains auteurs ont souligné le fait qu'ils n'ont pas observé de correspondance parfaite entre l'expression de la eGFP-GFAP, le patron d'expression des transporteurs et récepteurs glutaminergiques et le profil électrophysiologique. Ainsi, les travaux de Grass et coll. (2004) présentent l'idée selon laquelle, au sein des structures du tronc cérébral associées à la genèse du rythme respiratoire, on retrouve non pas deux, mais plutôt trois types d'astrocytes. Aux astrocytes passifs et à rectifications sortantes, s'ajoute alors un type intermédiaire (ou « astrocytes à rectification variable ») présentant des propriétés électrophysiologiques comme le potentiel membranaire ou la résistance d'entrée très semblables à celles des cellules GluT, mais présentant aussi des courants potassiques de type A voltage dépendant (mais plus faibles que ceux présents chez les cellules complexes) et des courants rectificatifs sortants transitoires. De même, Jabs et coll. (2005) ont souligné que, dans l'hippocampe, les cellules identifiées comme étant de type GluR, sur la base de leur morphologie, ne formeraient pas un groupe homogène; seuls 30 % d'entre elles transcrivant l'ARNm de la GFAP et exprimant le S100 β , reproduisant les observations rapportées par Wallraff et coll. (2004). Ces résultats électrophysiologiques et immunohistochimiques ont depuis été corroborés dans la couche CA1 de l'hippocampe (Zhou et coll., 2006 ; Schools et coll., 2006) et dans la couche IV du cortex somatosensoriel en barillets de la souris (Houades et coll., 2008).

6. *Le syncytium astrocytaire*

Les connexines forment un groupe de protéines transmembranaires très conservé et représenté chez les mammifères par 20 isoformes, dont les noms correspondent au poids moléculaire de leur forme théorique respective. Les connexines forment quatre passages transmembranaires et ont leurs domaines N- et C-terminaux localisés du côté cytoplasmique. Il en résulte 2 boucles extracellulaires qui sont essentielles à l'assemblage de la jonction Gap (Figure 12 A). L'hexamérisation des connexines produit un connexon, aussi appelé héli-canal. Deux connexons sur des prolongements adjacents peuvent alors s'assembler par l'entremise des trois groupements cystéines se trouvant sur les boucles extracellulaires et former une jonction Gap. Le canal a un diamètre de 92 Å, dans sa région cytoplasmique, mais celui du passage intercellulaire est bien inférieur. Sa largeur est de ~12 Å et permet tant la diffusion du K⁺, que la propagation de la réponse calcique et le passage de petites molécules (< 1kD) (Scemes et coll., 2007; Harris, 2007, pour des revues ; Maeda et coll., 2009 ; voir Figure 12). Différents types de connexines peuvent être rassemblés au sein d'un même connexon. De même, des connexons de type différents peuvent s'assembler pour former une jonction Gap. On parle alors respectivement de connexons hétéromériques et de jonctions Gap hétérotypiques (Altevogt et Paul 2004).

L'ensemble des cellules ainsi reliées forme un réseau, appelé syncytium. Le syncytium astrocytaire est au cœur de certaines des fonctions attribuées aux astrocytes comme la régulation de la concentration des ions extracellulaires (Amzica 2002 ; Amzica et coll., 2002 ; Wallraff et coll., 2006), la modulation de la physiologie synaptique (Cotrina et

coll., 1998; Rouach et coll., 2002 ; Adermark et Lovinger, 2008) et la coordination de réseaux neuronaux (Fellin et coll., 2004 ; Serrano et coll., 2006).

Lorsqu'ils ne sont pas apposés en jonctions Gap, les connexons sont habituellement fermés, en conditions physiologiques. Ceci est expliqué par le danger de fuite du contenu intracellulaire et de l'entrée massive d'ions extracellulaires que représente leur grande conductance. Certaines conditions physiologiques et pathologiques peuvent cependant induire leur ouverture (Sáez et coll., 2005 ; Scemes et coll. 2007, Harris, 2007, pour des revues)

Les pannexines forment une autre famille de protéines, composées de trois isoformes, dont les séquences partagent quelques homologies avec celles des connexines. Elles s'assemblent et forment des pannexons, une structure hexamérique analogue au connexon, qui est cependant incapable de se coupler pour former une jonction gap *in vivo* (Figure 12 A). Seules Panx1 et Panx2 sont retrouvées au sein du SNC. Panx1 est ubiquitaire dans le SNC ; son expression étant rapportée chez les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes (Scemes et coll., 2007 une revue). Chez les astrocytes, Panx1 est recrutée par l'activation du récepteur P2X₇ et permet la libération d'ATP suggérant un rôle dans la propagation des réponses calciques (Pelegri et Surprenant, 2006; Harris, 2007 ; Locovei et coll., 2007; Iglesias et coll., 2008). Panx2 est principalement retrouvée chez les neurones, mais elle est aussi exprimée chez les astrocytes en conditions pathologiques.

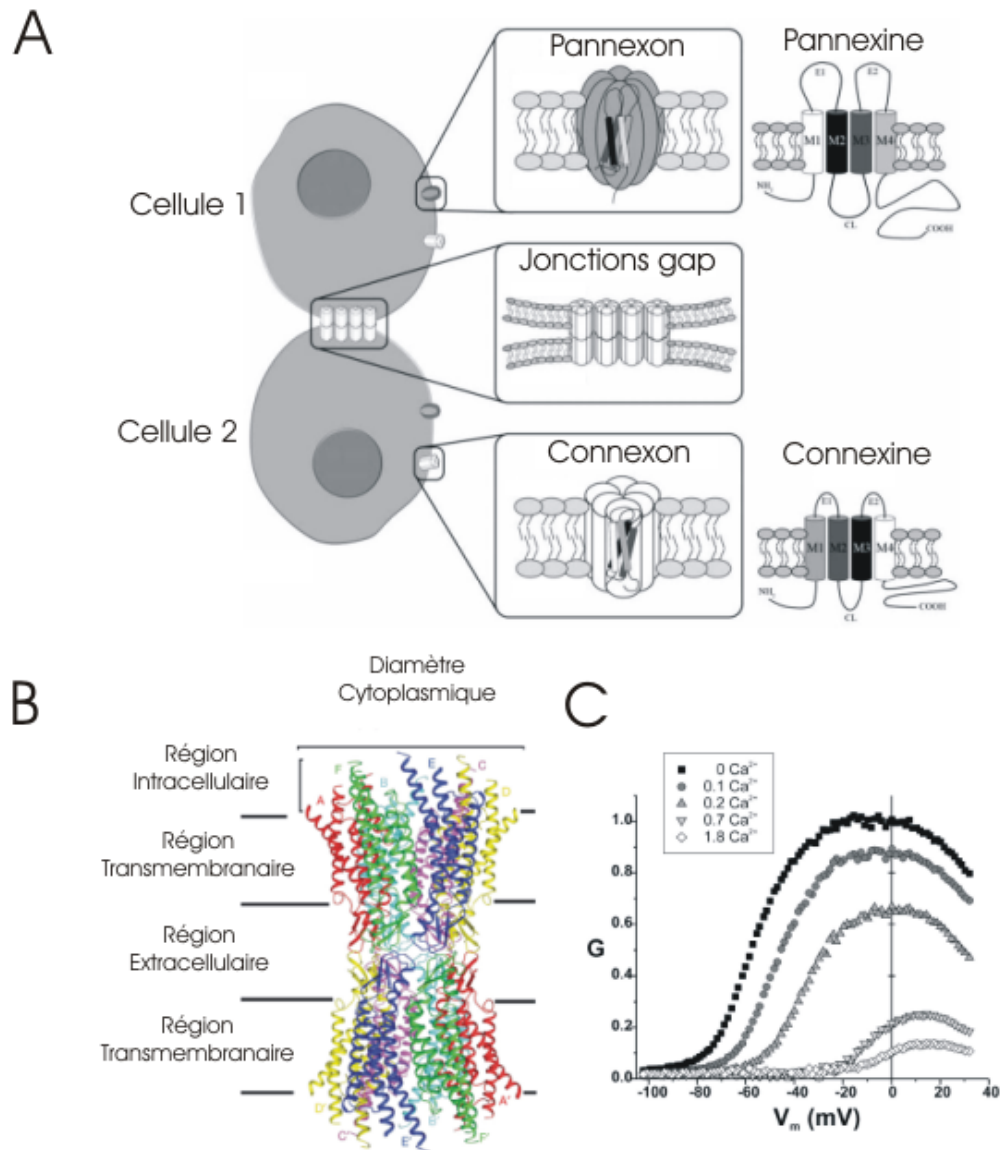


Figure 12. Formation et structure des jonctions gap. **A**, Les connexines et pannexines sont des protéines formant 4 passages transmembranaires et pouvant s'hexamériser en hémicanaux (respectivement connexons et pannexons). Les connexons sur des membranes adjacentes peuvent s'apposées l'une contre l'autre et former une jonction gap. (Adapté de Orellana et coll., 2009). **B**, Représentation en ruban de la structure d'une jonction gap avec les hélices alpha de chacune de leur 6 connexines représentées d'une couleur différentes. (Adapté de Maeda et coll., 2009). **C**, Augmentation de la perméabilité des connexons (ici Cx26) corrélée à la diminution de la concentration calcique extracellulaire (Adapté de Verselis et Srinivas, 2008).

6.1. Expression des connexines chez l'astrocyte

Les connexines exprimées diffèrent d'un type cellulaire à l'autre. Celles exprimées par les astrocytes et les oligodendrocytes étant entièrement différentes, les jonctions Gap établies entre ces cellules sont donc *de facto* hétérotypiques (Orthmann-Murphy et coll. 2007). Les principales connexines retrouvées chez les astrocytes sont les connexines Cx43 et Cx30.

Elles ont, à tout le moins au niveau cortical, des patrons développementaux d'expression bien différents et de fait peuvent jouer des rôles différents dans le développement. En effet, l'expression de Cx43 dans la couche 4 est apparente dès P6 (l'âge le plus jeune étudié par Houades et coll., 2008), mais selon une distribution très immature ne délimitant que de fins prolongements. La Cx30 quant à elle n'apparaît qu'à P15, mais révèle déjà une ségrégation des barillets.

La présence de Cx26 était jusqu'à récemment controversée, mais Orthmann-Murphy et coll. (2007) ont non seulement montré son expression, mais aussi sa colocalisation *in vivo*, avec la Cx47 des oligodendrocytes, lors de la formation de jonctions hétérotypiques. Enfin, dans une moindre mesure, l'expression des connexines Cx45, Cx40 et Cx46 a aussi été rapportée chez les astrocytes (Scemes et coll. 2007, pour une revue).

La conductance unitaire associée aux jonctions Gap varie considérablement en fonction du type de connexines impliquées ; variant entre 15 pS pour la Cx36 et 220 pour la Cx50

(Saez et coll., 2005, une revue). Plus significative dans le cas de la physiologie astrocytaire, la Cx43 et la Cx30 forment des jonctions Gap dont la conductance respective est de 110 pS et la 146 pS. Il est important de noter celle des héli-canaux formés des mêmes connexines est estimée au double (Orthmann-Murphy et coll. 2007).

6.2. Modulation du couplage

Le syncytium astrocytaire ne doit pas être considéré comme une organisation fixe. L'assemblage des jonctions gap, l'état d'ouverture des connexons et leur localisation dans la cellule sont affecté par les conditions locales tant intracellulaires qu'extracellulaires. La demie-vie de la Cx43 est notamment estimée entre 1 et 5 heures (Saffitz et coll., 2000) et celle de Panx1 supérieure à 6 heures (D'hondt et coll., 2009, une revue).

La probabilité d'ouverture des canaux formant une jonction Gap est dépendante du potentiel membranaire; au sens où la probabilité est maximale si la différence entre les potentiels membranaire de repos des deux cellules est de zéro (Bukauska et Peracchia 1997; Spray et coll., 2006 ; González et coll., 2007). Deux mécanismes partagés tant par les connexines que les pannexines sont à l'origine de l'effet du potentiel membranaire sur leur probabilité d'ouverture (Sáez et coll., 2005 ; Harris, 2009, pour des revues). Dans un premier temps, la modulation rapide du couplage dépendante du potentiel (« *fast V_j gating* ») est un mécanisme par lequel une région d'une des extrémités C ou N-terminale ou une des boucles cytoplasmiques des connexines obstruent partiellement le

canal (Bukauskas et coll., 2002; Bukauskas et Verselis, 2004 ; Paulauskas et coll., 2009). La région spécifique responsable de l'obstruction varie en fonction des connexines ou pannexines composant l'hémi-canal. Dans un second temps, le « loop-gating » est le mécanisme lent par lequel les hémi-canaux sont normalement maintenus complètement fermés à un potentiel membranaire négatif. Ce sont des résidus situés dans la première boucle extracellulaire et formant la bordure du canal qui sont responsables de cette sensibilité au potentiel et à la $[Ca^{2+}]_e$ en plus de servir à l'assemblage de la jonction gap (Verselis et coll., 2009).

Il a été démontré que la réduction de la $[Ca^{2+}]_e$ induit non seulement l'ouverture du connexon de Cx43, mais aussi une augmentation du volume cellulaire, ainsi qu'une incorporation de la Lucifer-yellow extracellulaire, de façon proportionnelle à la réduction de $[Ca^{2+}]_e$ (Quist et coll., 2000 ; Ye et coll., 2003 ; voir Figure 12 C). Les connexons s'ouvrent en effet lorsque la $[Ca^{2+}]_e$ chute en deçà de 0,5 mM (Ebihara et coll., 2003). Liu et coll. (2003) ont même observé une augmentation du nombre d'épisodes d'ouverture, lorsque la concentration passait 1,8 à 1,6 mM. Les pannexons sont quant à eux insensibles à la diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ (Bruzzone et coll., 2005).

Malgré que ce ne soit plus le cas aujourd'hui, l'inhibition de la connexion interastrocytaire a longtemps été perçue comme un moyen d'éliminer la contribution de l'activité astrocytaire. Dans cet esprit, de nombreux agents pharmacologiques ont été utilisés en conditions expérimentales pour altérer l'état d'ouverture des jonctions gap liant les astrocytes. Ces différentes substances ne sont cependant pas spécifiques aux astrocytes et ont d'autres effets sur les propriétés membranaires astrocytaires

intrinsèques, tels le potentiel membranaire, la résistance d'entrée et la capacitance. Ainsi, Ademark et Lovinger (2008) ont observé que l'exposition à l'octanol (1 mM) ou au carbenoxolone (100 μ M) induit une dépolarisation et une augmentation de la résistance d'entrée des astrocytes et diminuent significativement le nombre de cellules marquées par la lucifer-yellow diffusant d'une pipette de patch. Rouach et coll. (2000) ont de plus rapporté une réduction du couplage interastrocytaire par l'exposition à la TTX (1 μ M), à la bicuculline (100 μ M), à la picrotoxine (10 μ M) ou au CNQX (10 μ M), mais que cet effet ne passait pas par une diminution de l'expression de la Cx43.

En condition pathologique, l'interleukine-1 β et le facteur de nécrose tumorale- α , deux cytokines libérées par la microglie, inhibent la formation des jonctions gap, mais augmentent la perméabilité des héli-canaux fonctionnels. Ce phénomène peut sembler paradoxal, mais selon Retanal et coll. (2007), en cas d'ischémie, il permettrait de favoriser l'entrée de glucose dans l'astrocyte par les héli-canaux et d'assurer qu'il y reste en limitant la communication intercellulaire. De même, une diminution du pH intracellulaire, tel qu'il en survient notamment en cas d'ischémie cérébrale, inhibe la diffusion de marqueurs dans le réseau. Elle provoque non seulement une fermeture des jonctions GAP, mais aussi une internalisation de la Cx43, par l'entremise de la phosphorylation de son extrémité C-terminale suivant l'activation de la tyrosine kinase C-Src (de Feijter et coll., 1996; Nagy et coll., 1997; Spray et coll., 2002; Duffy et coll., 2004).

7. But du mémoire

Au sein de la région du pont délimitant les structures pouvant potentiellement former le GPC masticatoire, les neurones du NVsnpr constituent la principale population de cellules présentant les propriétés membranaires intrinsèques leur permettant d'en former le cœur rythmique. Sachant que le recrutement de ces neurones par des stimulations corticales ou périphériques s'étend sur plusieurs centaines de millisecondes et que la conductance sodique persistante à l'origine de la capacité de ces cellules à générer des bouffées de décharges est potentialisée par une exposition à un milieu extracellulaire pauvre en calcium, nous nous sommes intéressés à la contribution des astrocytes à la génération du rythme masticatoire, puisque la dynamique de leur activité est bien plus lente que celle des neurones et qu'ils sont associés à l'homéostasie des concentrations ioniques extracellulaires. Plus précisément, dans le cadre de cette étude, nous analysons l'effet du retrait du calcium extracellulaire sur les propriétés électrophysiologiques des astrocytes du NVsnpr-D. De plus, nous procédons à la caractérisation spatiale du syncytium astrocytaire au sein du noyau et considérons l'effet de la $[Ca^{2+}]_e$ et de la perfusion de l'ACSF, sur la modification de la diffusion d'une petite molécule (biocytine), dans le réseau astrocytaire. Ceci ayant pour but de faire un pas de plus vers la réalisation de l'objectif à plus long terme, qui est de déterminer la place du concept relativement récent de synapse tripartite (Figure 10) dans la genèse du rythme au cœur du GPC masticatoire et d'élucider les mécanismes et l'organisation qui en assure le fonctionnement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Animaux et acquisition des tranches

Toutes les manipulations ont été effectuées conformément aux normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et approuvées par le Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux de l'Université de Montréal (numéro de protocole du CDEA : 07-143).

Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé 70 rats Sprague Dawley (Charles River, Montréal, Québec, Canada), âgés entre 16 et 24 jours. Les rats ont été décapités à l'aide d'une guillotine et leurs cerveaux, une fois extraits, ont rapidement été transférés dans un liquide cébrospinal artificiel (ACSF) à haute teneur en sucrose et faible teneur en Ca^{2+} , maintenu à basse température (Concentration en mM : Sucrose 252, KCl 3, NaHCO_3 26, KH_2PO_4 1.25, MgSO_4 4, Dextrose 25, CaCl_2 0.2, oxygéné par un mélange de 95% d' O_2 et 5% CO_2 , pH 7.4, 4°C). La coupe des tranches a été effectuée à l'aide d'un vibratome (Leica VT1000s, Allemagne); de sorte à obtenir des coupes transversales de 300 à 350 μm d'épaisseur, au niveau du NVsnpr (voir Figure 13A). Les tranches ont ensuite été déposées dans une chambre de stockage, remplie d'un ACSF normal et contenant du Ca^{2+} (Concentration en mM : NaCl 126, KCl 3, NaHCO_3 26, KH_2PO_4 1.25, MgSO_4 1.3, Dextrose 25, CaCl_2 1.6, oxygéné par un mélange de 95% d' O_2 et 5% CO_2 , pH 7.4 à température de la pièce), pour au moins une demie-heure ou jusqu'à leur utilisation.

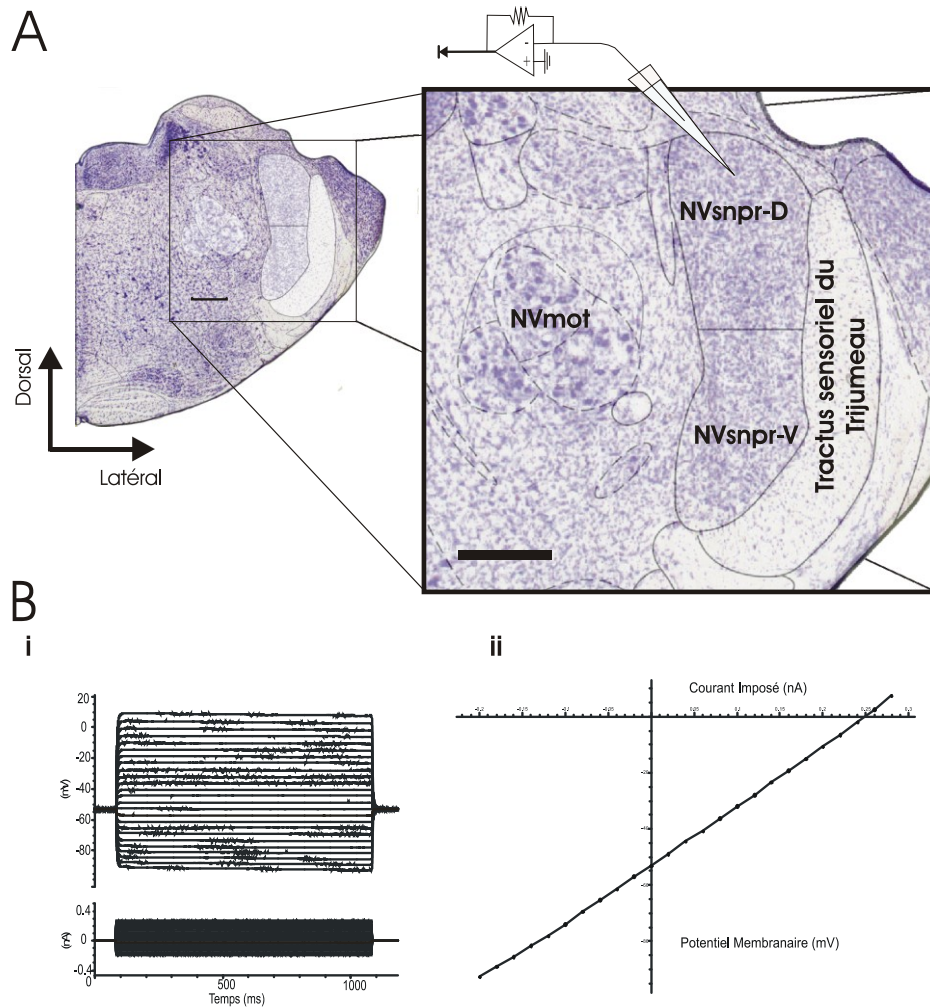


Figure 13. Structure étudiée et enregistrements. **A**, Les cellules enregistrées se trouvaient dans la moitié dorsale du noyau sensoriel principal du nerf trijumeau (NVsnpr-D). Échelle de 500 µm) **B**, Enregistrement d'un protocole de Step IV où l'on observe une variation du potentiel membranaire induite par l'imposition de pulses de courant d'une durée de 1000 ms en augmentant successivement l'amplitude des pulses de 0,05 nA, à partir de - 0,2 nA (**i**). La nature astrocytaire des cellules enregistrées a été confirmée par l'observation de la dynamique linéaire de la relation I-V (**ii**). NVmot: noyau moteur du trijumeau, NVsnpr-V: région ventrale du noyau sensoriel principal du trijumeau. (Adapté de Paxinos et Watson, 2004).

2. Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements ont été réalisés dans une chambre à immersion perfusée (1,5 ml/min) d'un ACSF oxygéné, à température ambiante. Deux types d'ACSF différents ont été utilisés lors des enregistrements. L'ACSF avec Ca^{2+} (1,6 mM) servait de contrôle de condition physiologique, alors que l'ACSF sans Ca^{2+} (0 mM) représentait la condition connue pour engendrer un patron de décharge en bouffées rythmiques dans les neurones du NVsnpr-D (Brocard et coll. 2006). Afin de maintenir la concentration d'ions divalents constante entre ces deux types d'ACSF, nous avons substitué le CaCl_2 par du MgCl_2 dans la formulation de l'ACSF sans Ca^{2+} (Concentration en mM : NaCl 126, KCl 3, NaHCO_3 26, KH_2PO_4 1.25, MgSO_4 1.3, Dextrose 25, MgCl_2 1.6, oxygéné par un mélange de 95% d' O_2 et 5% CO_2 , pH 7.4). Dans les cas où un ACSF sans Ca^{2+} a été utilisé, nous avons laissé les tranches reposer 30 minutes supplémentaires dans le milieu sans Ca^{2+} , avant de procéder aux premiers enregistrements, afin de s'assurer que les données recueillies correspondent bien à l'effet d'une absence de Ca^{2+} dans l'ACSF.

La localisation des structures étudiées a été confirmée par l'observation au microscope (Nikon, EclipseE600FN, Tokyo, Japon) à faible grossissement (4x). Nous avons sélectionné nos cellules pour l'enregistrement à plus fort grossissement (Objectif à immersion de 40x) sur la base de leur morphologie en contraste de Nomarski (DIC); les astrocytes ayant un corps cellulaire de forme ovoïde dépassant rarement 10µm de diamètre et peu ou pas de prolongements discernable, dans ces conditions.

Les pipettes de patch utilisées au cours des enregistrements par patch-clamp en configuration « cellule entière » avaient une résistance variant entre 9 et 16M Ω . Elles ont été tirées à partir d'un étireur d'électrode horizontal (Sutter Instruments, Flaming/Brown P-97, Novato, Californie, États-Unis), sur des capillaires de verre de 1 mm de diamètre avec filament interne (World Precision Instruments, 1B100F-4, Sarasota, Floride, États-Unis). Les pipettes de patch étaient remplies d'une solution interne à base de K⁺-gluconate contenant de la biocytine (en mM : K⁺-gluconate 140, NaCl 5, MgCl₂ 2, HEPES 10, EGTA 0.5, ATP 2, GTP 0.4, Biocytine 0,2%, pH 7.2-7.3). La biocytine pouvant diffuser dans les jonctions gap, sa révélation permet de visualiser l'étendue du couplage intercellulaire émanant de la cellule enregistrée. L'osmolarité de cette solution mesurée sur un osmomètre (Advanced Instruments Inc, Model 3320 Micro-Osmometer, Norwood, Massachusetts, États-Unis), par diminution du point de congélation, devait se situer entre 290 et 300 mOsm et servait de référence pour l'osmolarité de l'ACSF ; le seuil de différence maximale tolérable entre ces solutions étant fixé à 10 mOsm.

Une légère pression appliquée à l'arrière de la pipette nous a permis de créer une lente éjection de la solution interne et ainsi de déplacer la micropipette dans le tissu en direction de la cellule ciblée; sans que la pipette ne s'accroche au tissu et ne soit obstruée par des débris. L'observation d'une légère déformation de la membrane cellulaire, induite par l'éjection de solution interne, à l'approche de la micropipette, nous informait qu'elle était bien positionnée. À l'élimination de la pression, à l'intérieur de la pipette, suivait un rapprochement puis le contact entre la membrane cellulaire et le bout

de la pipette de patch, ce qui induisait une augmentation de la résistance, telle que mesurée par l'amplificateur Axoclamp 2B à l'aide de l'outil d'acquisition Clampex de la trousse pCLAMP (Axon Instruments, Molecular Devices Corporation, version 8.2, Union City, Californie, États-Unis). Une légère pression négative appliquée à la pipette de patch permettait ensuite d'augmenter la résistance de façon importante et d'établir un « gigaseal » (résistance $> 1\text{G}\Omega$), éliminant ainsi à toutes fins pratiques les fuites de courant. Ayant établi le gigaseal, la capacitance de la cellule était compensée, à la suite de quoi une brève augmentation de la pression négative provoquait la rupture de la membrane, nécessaire à l'établissement de la configuration « cellule entière » du patch-clamp.

Deux types de protocoles électrophysiologiques ont été utilisés pour l'enregistrement des cellules, tous deux en mode courant-imposé. Dans le premier type, « Gap-Free », nous enregistrons seulement le potentiel membranaire de repos et l'activité spontanée des cellules, alors que dans le deuxième type « Step I-V », nous imposons des courants de façon sérielle à la cellule, par pulse de 1000 ms, en incrémentant l'intensité du courant de 0,05nA à chaque cycle (de -0,25 à +1.2nA). L'échantillonnage des données numérisées a été réalisé à une fréquence plus grande ou égale à 10kHz à l'aide de pCLAMP 8.2 (Axon Instruments) et les données ont été sauvegardées sur le disque à des fins d'analyses ultérieures. Nous avons maintenu le temps d'enregistrement des cellules constant à 20 minutes, de sorte à homogénéiser le temps de diffusion de la biocytine dans le syncytium; après quoi nous retirions délicatement la pipette de patch, de sorte à ne pas arracher la cellule enregistrée. Afin d'éviter toute confusion quant aux résultats

associés au marquage de la biocytine, seule une tentative d'enregistrement était possible par noyau, nous limitant donc au maximum à deux cellules enregistrées par tranches.

3. Révélation de la biocytine

Une fois les enregistrements sur une tranche terminés, elle était fixée dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 24h, puis transférée dans une solution de tampon phosphate salin (PBS). En bref, notre procédé de révélation de la biocytine utilisait une réaction à la 3,3'-diaminobenzidine comme chromogène (DAB, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, États-Unis) suivant une incubation dans une solution de complexe avidine-biotine couplé à une peroxydase (Vector Laboratories, ABC Kit Vectastain, Burlingame, Californie, États-Unis).

Suite à la fixation et après avoir été rincées trois fois dix minutes dans du PBS, les tranches étaient incubées une heure dans une solution de tampon phosphate salin (PBS) avec H_2O_2 0,5% afin d'éliminer les faux positifs liés aux peroxydases endogènes. Les tranches étaient de nouveau rincées 3 fois dix minutes dans du PBS puis mises à incuber 24h dans la solution ABC, composée de PBS + TRITON-X 0,1% + ABC 1 :100 (Vector Laboratories, ABC Kit Vectastain, Burlingame, Californie, États-Unis). Après trois rinçages de dix minutes dans le PBS, les tranches étaient incubées dans une solution de PBS avec DAB 0,05% pendant 20 minutes, puis dans une solution PBS / DAB 0,05% / H_2O_2 0,03%. La réaction de coloration est arrêtée en transférant de nouveau les tranches dans le PBS. Après cinq derniers rinçages de dix minutes dans le PBS, les tranches

étaient montées sur des lames, mises à sécher pour la nuit sur une plaque chauffante (34 °C) et puis déshydratées par un passage d'une minute dans des bains d'alcool de 70%, 95% et 100%, puis de Xylène avant d'être montées avec du Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvanie, États-Unis). Nous avons pris des photos en lumière visible, à plusieurs grossissements (1x, 4x, et 10x), des tranches marquées à la biocytine, sur un microscope EclipseE600 (Nikon) avec le logiciel ACT-1 (Nikon, version 2.7), que nous avons enregistrées sur le disque pour analyses ultérieures.

4. Analyse des tracés électrophysiologiques

Le potentiel membranaire de repos initial (V_{m_i}) a été défini comme étant le potentiel lu cinq minutes après l'établissement du patch, un temps nous assurant de sa stabilisation. Nous avons déterminé la résistance d'entrée (R_i) des cellules à partir des fichiers obtenus à l'aide du protocole « Step I-V » en utilisant la fonction implémentée dans l'outil d'analyse Clampfit de pCLAMP8.2 (Axon Instruments). Pour nous assurer de la linéarité de la relation I-V des cellules enregistrées, nous utilisons la représentation graphique du potentiel membranaire enregistré, à la fin de l'injection de courant (1000 ms), en fonction de l'intensité du courant imposé (voir Figure 13B). Pour répondre aux critères électrophysiologiques d'acceptabilité, une cellule devait : ne pas présenter de potentiels d'action à la dépolarisation, avoir un potentiel membranaire de repos inférieur à -50mV et avoir une relation I-V suivant une dynamique linéaire.

5. Analyse du couplage

Les photos des tranches ont été analysées à l'aide du logiciel SimplePCI (Compix, Imaging System, version 5.3, Cranberry Township, Pennsylvanie, États-Unis). Nous avons utilisé les photos prises aux grossissements 1 et 4x pour vérifier l'état du tissu, la possibilité de marquage autour du noyau et pour créer des repères afin de distinguer la portion dorsale du reste du NVsnpr. Les axes X et Y ont respectivement été associés aux axes médio-latéral et ventro-dorsal de la tranche (Figure 14A). Toutes les mesures sur les réseaux ont été réalisées à partir des photos prises à 10x, ce grossissement permettant de couvrir l'ensemble du NVsnpr-D en une seule photo, tout en conservant une bonne résolution spatiale permettant de distinguer les cellules marquées. Tel que précédemment déterminé à l'aide d'un étalon, nous avons appliqué aux mesures sur les photos prises à 10x, un facteur de conversion de 0,316 $\mu\text{m}/\text{pixel}$.

Quatre paramètres nous ont permis d'évaluer l'intensité du couplage interastrocytaire : le nombre de cellules marquées, l'aire du réseau (en mm^2), la couverture relative du NVsnpr-D par le réseau (en pourcentage) et la densité cellulaire du réseau (cellules/ mm^2). Pour chacun des réseaux, nous avons noté le nombre de cellules marquées et leur position individuelle sur la photo. Nous avons déterminé la cellule enregistrée et transposé les coordonnées des cellules marquées de sorte à avoir les coordonnées de la cellule enregistrée comme référentiel. Nous avons ensuite mesuré l'aire de la surface ceinturant l'ensemble des corps cellulaires du réseau; que nous avons ensuite comparé avec l'aire du NVsnpr-D pour calculer le pourcentage de la surface du

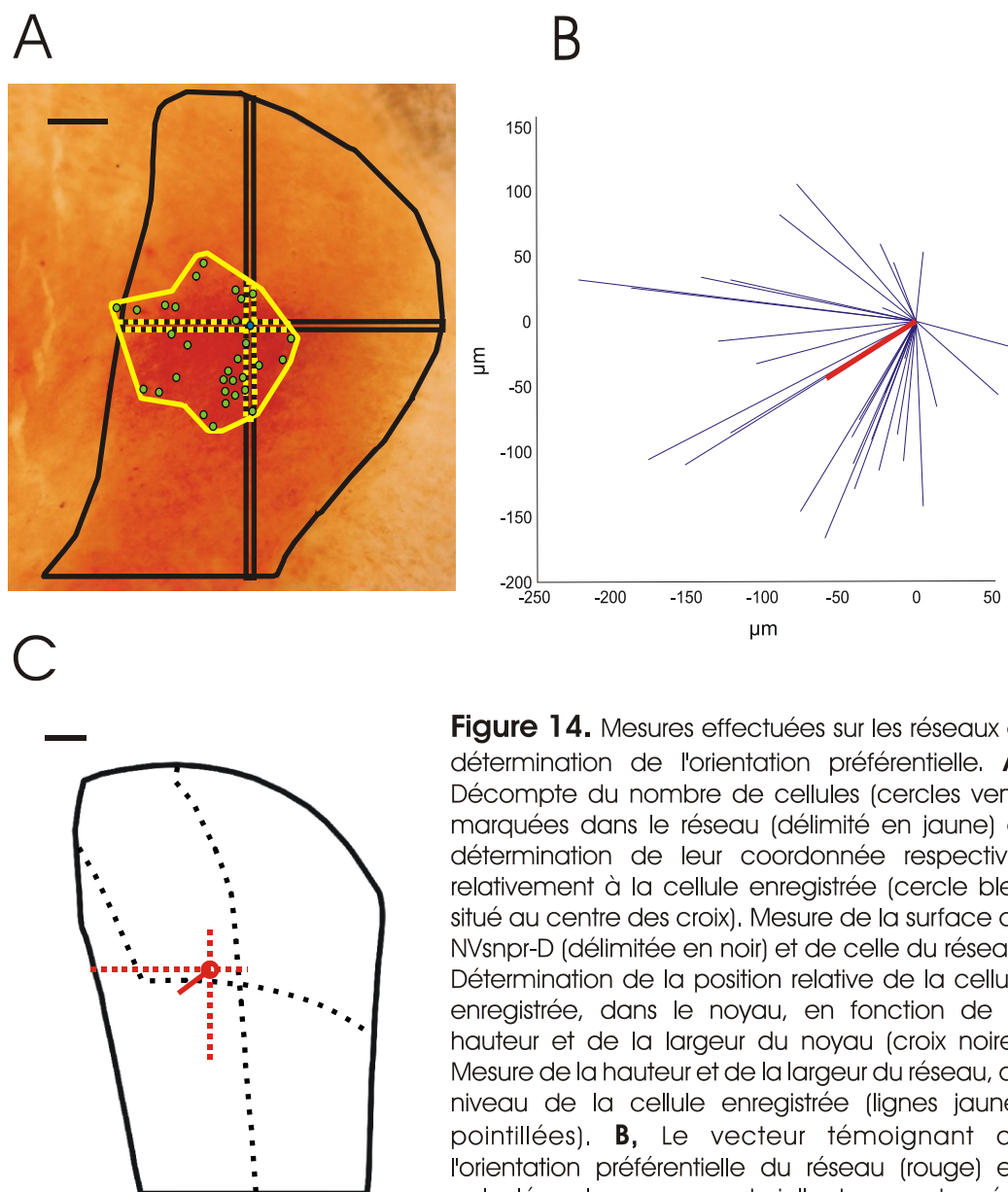


Figure 14. Mesures effectuées sur les réseaux et détermination de l'orientation préférentielle. **A**, Décompte du nombre de cellules (cercles verts) marquées dans le réseau (délimité en jaune) et détermination de leur coordonnée respective, relativement à la cellule enregistrée (cercle bleu situé au centre des croix), Mesure de la surface du NVsnpr-D (délimitée en noir) et de celle du réseau. Détermination de la position relative de la cellule enregistrée, dans le noyau, en fonction de la hauteur et de la largeur du noyau (croix noire). Mesure de la hauteur et de la largeur du réseau, au niveau de la cellule enregistrée (lignes jaunes pointillées). **B**, Le vecteur témoignant de l'orientation préférentielle du réseau (rouge) est calculé par la somme vectorielle des coordonnées de l'ensemble des cellules marquées (vecteurs en bleu), par rapport à la cellule enregistrée; puis divisé par le nombre de cellules marquées. **C**, Transposition de la hauteur et la largeur du réseau (croix rouge en pointillée) ainsi que de l'orientation préférentielle du réseau (ligne rouge pleine), dans le NVsnpr-D théorique. Les lignes noires pointillées représentent les axes correspondant à 50% de la hauteur et de la largeur du noyau. Les échelles mesurent $100\mu\text{m}$.

NVsnpr-D couverte par le réseau (voir Figure 14A). La densité cellulaire du réseau a été calculée par le rapport entre le nombre de cellules marquées et la surface du réseau. Nous avons également mesuré la longueur du réseau selon les axes x et y, au niveau de la cellule enregistrée.

Bien que les trois premiers paramètres témoignent de la même information, la taille du réseau, ils ne sont cependant pas sensibles aux mêmes facteurs. Notamment, nous avons remarqué que la taille et les détails de la forme du NVsnpr-D varient considérablement le long de l'axe rostro-caudal et seul le paramètre décrivant la taille du réseau en pourcentage de l'aire du NVsnpr, en tient compte. De plus, deux réseaux couvrant la même surface, mais dont la densité cellulaire diffère présenteront un nombre différent de cellules marquées.

Enfin, nous avons caractérisé la forme et l'orientation des réseaux astrocytaires selon trois paramètres; l'excentricité de la surface (ou « aspect ratio »), la longueur de la résultante normalisée (μm) et la différence angulaire entre l'orientation de la résultante du réseau et le vecteur liant la cellule enregistrée au centre du NVsnpr-D.

L'aspect ratio du réseau permet d'en estimer l'élongation. Nous l'avons calculé par le rapport entre la longueur maximale et la largeur maximale; la longueur maximale ayant été définie comme la plus longue droite possible entre deux points de la surface du réseau et la largeur maximale comme la plus longue droite, orthogonale à la longueur maximale, séparant deux points sur la surface du réseau. En conséquence de quoi une

diffusion circulaire aurait un aspect ratio de 1 et toute élongation du réseau dans une dimension du plan en augmenterait la valeur.

La résultante normalisée (ou la norme du vecteur moyen) a été utilisée pour vérifier l'existence d'une orientation préférentielle du réseau et déterminer son importance. Elle correspond à la somme vectorielle des coordonnées de l'ensemble des cellules d'un réseau (par rapport à la cellule enregistrée), divisée par le nombre de cellules marquées; de sorte à isoler l'effet de la dispersion des cellules et limiter l'effet de la taille du réseau sur la norme du vecteur. La taille de la résultante normalisée rend donc compte, lorsqu'elle est nulle, d'une symétrie de la diffusion et dans le cas contraire, de la présence et de l'importance d'une orientation préférentielle du syncytium astrocytaire, au sein du NVsnpr-D, mais sans révéler d'informations sur sa direction (voir Figure 14B).

Bien qu'elles nous renseignent, toutes deux sur une dimension de la configuration spatiale du syncytium astrocytaire au sein du NVsnpr-D, l'excentricité de la surface du réseau et la résultante normalisée ne rendent pas compte de la même information. Effectivement, l'excentricité témoigne seulement de la forme du réseau, de son élongation, sans tenir compte de la position de la cellule enregistrée en son sein. Réciproquement, la résultante normalisée ne tient pas compte de la forme du réseau, mais uniquement de la symétrie de la diffusion de la biocytine dans le réseau, par rapport à la cellule enregistrée.

La direction de l'orientation préférentielle est exprimée en fonction de la direction du centre du NVsnpr-D, par la soustraction entre l'angle de la résultante du réseau et l'angle du vecteur liant la cellule enregistrée au centre relatif du NVsnpr-D théorique, d'où l'expression de « différence angulaire » employée ici pour y référer. Dans le contexte du système d'axes courbes du noyau, le centre relatif a alors été défini comme le point situé à la fois à la moitié de la hauteur et de la largeur du NVsnpr-D théorique. La différence angulaire est ensuite exprimée selon une plage d'angles s'échelonnant de -180 à $+180^\circ$ ou par sa valeur absolue, de 0 à 180° .

Nous avons utilisé une dernière approche pour étudier l'orientation préférentielle des réseaux qui en combine à la fois la direction et l'importance. Pour ce faire, nous avons écrit et utilisé un programme dans l'environnement Matlab (The Mathworks, Version R2006b, Natick, Massachussetts, États-Unis) permettant de compiler l'ensemble des réseaux au sein d'un NVsnpr-D théorique. Les coordonnées relatives des cellules enregistrées, des résultantes normalisées et des croix représentant la hauteur et la largeur des réseaux ont alors été adaptées à un NVsnpr-D théorique (Paxinos et Watson, 2004), dont la surface a été scindée en quatre cadrans. Les réseaux ont ensuite été regroupés selon leur appartenance à ces cadrans, puis leurs données combinées pour obtenir le réseau moyen par cadrans.

Pour répondre aux critères d'acceptabilité liés au marquage, une cellule devait voir sa localisation dans le NVsnpr-D confirmée par la révélation de la biocytine, avoir un

rapport signal/bruit assez fort pour permettre de bien distinguer le réseau et être sur une tranche dont l'état du tissu ne compromettait pas les mesures.

6. Analyses de l'effet de la position

Afin de pouvoir analyser les caractéristiques des cellules enregistrées et des réseaux associés, relativement au NVsnpr-D, nous avons déterminé la position relative des cellules enregistrées dans le noyau. Pour ce faire, nous avons mesuré la largeur et la hauteur du noyau au niveau de la cellule enregistrée et mesuré la distance entre la cellule et le centre du noyau à ce niveau, dans l'axe médio-latéral (x) et ventro-dorsal (y) (voir Figure 14A).

Afin d'étudier l'effet de la position de la cellule enregistrée dans le noyau sur les paramètres analysés, une routine permettant de générer et d'illustrer l'interpolation en trois dimensions de ces paramètres, selon la position relative dans le NVsnpr-D ou la distance (en μm) de la bordure la plus près, dans les deux axes, a été écrite et utilisée sous Matlab. Nous avons alors calculé dans les deux axes la distance de la bordure par :

$$x = \left(0,5 - \left| \frac{\text{Position relative du patch en } x - 50}{100} \right| \right) \cdot \text{Largeur du noyau (micron)}$$

$$y = \left(0,5 - \left| \frac{\text{Position relative du patch en } y - 50}{100} \right| \right) \cdot \text{Hauteur du noyau (micron)}$$

7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS (IBM Corporation, SPSS inc, version 17.0, Chicago, Illinois, États-Unis). La normalité de la distribution de chacun des paramètres a été mise à l'épreuve à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov pour un échantillon (avec correction de Lilliefors). Dans le cas où la condition de normalité s'avérait satisfaite, nous avons utilisé le test T de Student. Dans ce cas, les estimateurs de la valeur centrale sont donnés par la moyenne et l'erreur-type. Dans le cas contraire, le test du U de Mann-Whitney fut utilisé. Ce test non paramétrique est moins sensible que le test de Kolmogorov-Smirnov pour deux échantillons, à la non-uniformité de la forme de la distribution. Dans ce cas, l'estimateur de la valeur centrale est donné par la médiane suivie de l'intervalle.

Afin de comparer aux distributions uniforme et gaussienne la distribution de l'orientation préférentielle des réseaux, dans les différentes conditions, nous avons utilisé le test de Kolmogorov-Smirnov pour un échantillon. Pour la comparaison avec une orientation précise de 0° , nous avons utilisé le test de comparaison de moyenne pour un échantillon de Student (relativement tolérant à la normalité de la distribution). Les relations significatives entre les groupes ont été soulignées dans les figures à l'aide d'étoiles (* $p < 0,05$).

RÉSULTATS

1. Paramètres et variables considérés lors de l'analyse

Nous avons enregistré 90 cellules gliales dans la moitié dorsale du NVsnpr (NVsnpr-D) et de ces cellules, nous avons conservé celles respectant les critères de sélection électrophysiologiques et de couplage (voir méthodologie), soit 45 cellules. Trois types de paramètres ont alors été analysés : les paramètres électrophysiologiques, ceux associés à l'étendue du couplage intercellulaire et finalement ceux analysant la forme et l'orientation des syncytia astrocytaires. L'influence de trois variables sur ces mesures fut évaluée, soit : la concentration calcique extracellulaire, le sens de la perfusion et la position de l'astrocyte enregistré.

1.1. Pourquoi le calcium extracellulaire

Le modèle de rythmogénèse de la mastication proposé par notre laboratoire repose sur une diminution de la concentration calcique extracellulaire ($[Ca^{2+}]_e$) pour l'activation des conductances sodiques persistantes responsables des bouffées rythmiques des neurones du NVsnpr-D. Il était donc important d'évaluer l'impact d'une telle baisse de la $[Ca^{2+}]_e$ sur le couplage astrocytaire. Pour ce faire, nous avons procédé à des enregistrements en aCSF normal (1,6 mM Ca^{2+} , n= 14) et en aCSF dépourvu de Ca^{2+} (0 mM, n=31).

1.2. Pourquoi étudier le sens de la perfusion

Comme l'orientation du réseau était analysée par rapport au centre du noyau et que les mécanismes soutenant la communication interastrocytaire s'expliquent en partie par la libération et la diffusion de messager extracellulaire et que cette dernière est influencée par le sens de la perfusion (Hassinger et coll., 1996 ; Zanotti et Charles, 1997; Stout et Charles, 2002; Stout et Charles, 2003; Bowser et Khakh, 2007), il nous a donc semblé important d'en analyser l'effet sur les paramètres mesurés.

Les tranches étaient toujours placées dans la chambre d'enregistrements de façon à ce que l'axe longitudinal (dorso-ventral) du NVsnpr soit perpendiculaire à l'axe de la perfusion. Les cellules enregistrées pouvant être situées dans le noyau gauche ou droit de la tranche et de part et d'autre de la ligne centrale du noyau, nous avons pu classer ces cellules selon le sens relatif de la perfusion. Dans 25 cas la perfusion allait dans la même direction (sens +1) qu'une flèche reliant la cellule enregistrée au centre du noyau, alors que dans 20 cas, elle allait dans la direction opposée (sens-1) (voir Figure 15 A). Nos résultats montrent que les proportions de cellules enregistrées en présence et en absence de calcium extracellulaire ne diffèrent pas significativement entre les groupes formés selon le sens de la perfusion (χ^2 de Pearson avec 1 degré de liberté, signification asymptotique bilatérale de 0,428, voir Figure 15 B).

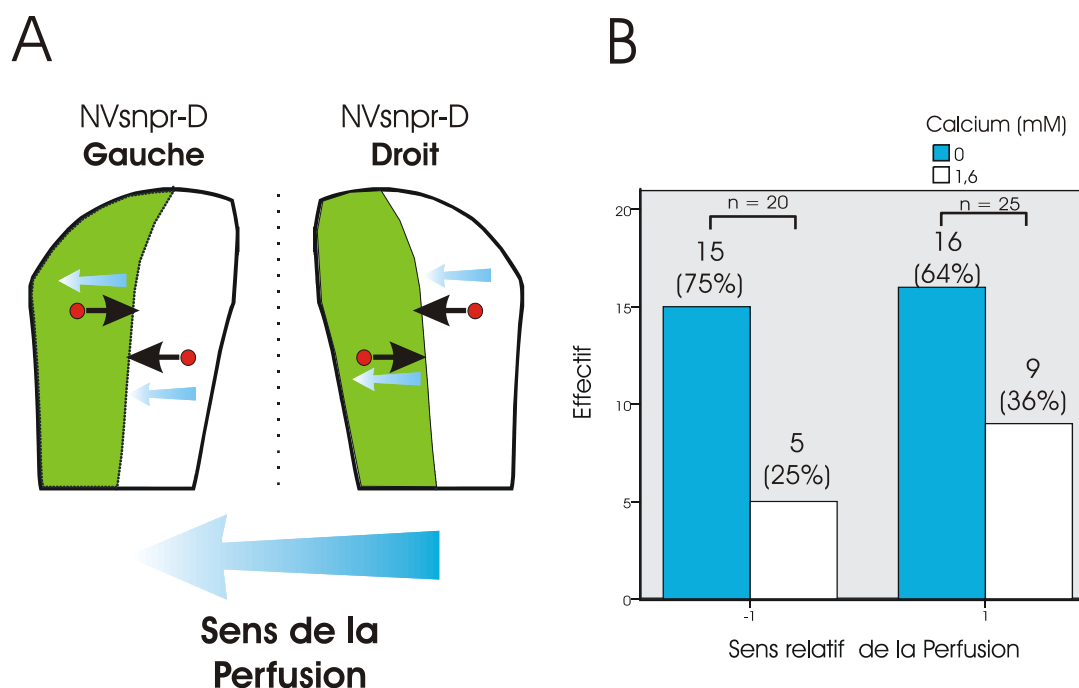


Figure 15. Classification des réseaux en fonction du sens relatif de la perfusion. **A**, Le sens relatif de la perfusion est défini par rapport à la cellule enregistrée et la direction de la ligne médiane relative du noyau. Dans les régions représentée en vert, la perfusion est orientée dans le sens opposé à la ligne médiane (**sens -1, n= 20**) alors que dans les régions blanches la perfusion est orienté dans le même sens (**sens +1, n= 25**), que la ligne médiane. **B**, Les proportions de cellules enregistrées en absence (bleu) comme en présence (blanc) de calcium extracellulaire ne sont pas significativement différentes entre les groupes basés sur le sens relatif de la perfusion (Khi² de Pearson avec 1 degré de liberté, $p= 0,428$).

1.3. Pourquoi étudier la position

Afin d'étudier l'existence d'une organisation anatomofonctionnelle liant le réseau astrocytaire à l'activité neuronale observée au sein du NVsnpr-D, nous avons également observé l'effet de la position des astrocytes enregistrés, sur chacun des paramètres étudiés. La position des astrocytes, dans le NVsnpr-D, a alors été exprimée à la fois en termes de position relative dans le noyau (pourcentage de la hauteur et de la largeur du noyau) et de la distance de la bordure la plus près (en μm), dans les axes x et y. Les dimensions du NVsnpr-D et les détails de la forme pouvant cependant varier avec le niveau rostro-caudal de la coupe, la position relative est plus adaptée pour apprécier la variation des paramètres étudiés à l'échelle du noyau, mais pour étudier la variation induite par la proximité de la bordure du noyau, dans les paramètres observés, la distance en unité absolue s'impose.

2. Normalité de la distribution des valeurs mesurées

Pour la majorité des paramètres étudiés, au moins un des groupes de valeurs obtenues ne respecte pas une distribution normale (voir Tableaux I et II, pages 85 et 86), après la classification des données selon une des deux modalités (Test de Kolmogorov-Smirnov à un échantillon, avec correction de Lilliefors). Afin de comparer ces groupes, nous avons donc principalement eu recours à un test non paramétrique et choisi le U de Mann-Whitney.

Tableau I. Test de normalité de la distribution, en fonction du calcium extracellulaire.

	Calcium (mM)	n	Kolmogorov-Smirnov §		
			Statistique	ddl	Signification
V_m (mV)	0	31	0,102	31	0,200
	1,6	14	0,220	14	0,064
R_i (MΩ)	0	31	0,239	31	0,000 *
	1,6	14	0,165	14	0,200
Nombre de cellules	0	31	0,195	31	0,004 *
	1,6	14	0,256	14	0,013 *
Aire du Réseau (μm²)	0	31	0,178	31	0,014 *
	1,6	14	0,237	14	0,031 *
NVsnpr couvert (%)	0	31	0,106	31	0,200
	1,6	14	0,236	14	0,033 *
Densité du réseau (cell/μm²)	0	31	0,372	31	0,000 *
	1,6	14	0,169	14	0,200
Aspect Ratio	0	31	0,167	31	0,027 *
	1,6	14	0,277	14	0,005 *
Résultante Normalisée (μm)	0	31	0,184	31	0,009 *
	1,6	14	0,251	14	0,017 *
Différence angulaire [-180,180]	0	31	0,116	31	0,200
	1,6	14	0,257	14	0,013 *
Différence angulaire [0,180]	0	31	0,210	31	0,001 *
	1,6	14	0,188	14	0,197

§ Avec correction de signification de Lilliefors

* p < 0,05

Tableau II. Test de normalité de la distribution, en fonction du sens de la perfusion.

	Sens Perf	n	Kolmogorov-Smirnov §		
			Statistique	ddl	Signification
V_m (mV)	-1	20	0,103	20	0,2000
	1	25	0,135	25	0,2000
R_i (MΩ)	-1	20	0,234	20	0,0055 *
	1	25	0,213	25	0,0050 *
Nombre de cellules	-1	20	0,142	20	0,2000
	1	25	0,249	25	0,0003 *
Aire du Réseau (μm²)	-1	20	0,162	20	0,1799
	1	25	0,246	25	0,0004 *
NVsnpr couvert (%)	-1	20	0,112	20	0,2000
	1	25	0,229	25	0,0016 *
Densité du réseau (cell/μm²)	-1	20	0,335	20	0,0000 *
	1	25	0,307	25	0,0000 *
Aspect Ratio	-1	20	0,220	20	0,0119 *
	1	25	0,187	25	0,0246 *
Résultante Normalisée (μm)	-1	20	0,171	20	0,1296
	1	25	0,239	25	0,0007 *
Différence angulaire [- 180,180]	-1	20	0,105	20	0,2000
	1	25	0,114	25	0,2000
Différence angulaire [0,180]	-1	20	0,200	20	0,0352 *
	1	25	0,168	25	0,0678

§ Avec correction de signification de Lilliefors

* p < 0,05

3. Propriétés électrophysiologiques

Les valeurs obtenues dans cette étude, pour le potentiel membranaire de repos et la résistance d'entrée, s'éloignent légèrement de ce qui est classiquement observé chez les astrocytes. En effet, les astrocytes enregistrés sont plutôt dépolarisés et la plage de

données de la résistance d'entrée s'étend à des valeurs considérablement plus élevées (Tableaux III et IV, Figure 16 et 17).

Tableau III. Statistiques descriptives des paramètres électrophysiologiques et test de comparaison non paramétrique U de Mann-Withney, en fonction de la concentration calcique extracellulaire.

	Calcium (mM)	n	Moyenne	SEM	Médiane	Minimum	Maximum	U de Mann-Whitney		
								U	Z	p
V_m (mV)	0	31	-63,8	5,8	-63,0	-78,0	-55,0	175	-1,03	0,30
	1,6	14	-64,9	5,6	-65,5	-71,0	-50,0			
R_i (MΩ)	0	31	63	40	52	21	196	190	-0,66	0,51
	1,6	14	51	26	50	12	103			

Tableau IV. Statistiques descriptives des paramètres électrophysiologiques et test de comparaison non paramétrique de Mann-Withney (U), en fonction du sens relatif de la perfusion.

	Sens Perf	n	Moyenne	SEM	Médiane	Minimum	Maximum	U de Mann-Whitney		
								U	Z	p
V_m (mV)	-1	20	-63,7	1,18	-64,0	-78,0	-56,0	213	-0,85	0,40
	1	25	-64,6	1,21	-65,0	-72,0	-50,0			
R_i (MΩ)	-1	20	64	9	54	23	196	224	-0,59	0,55
	1	25	56	7	50	12	142			

3.1. Effet du calcium extracellulaire

Comme en témoignent le Tableau III et la Figure 16, nous n'avons pas observé d'effet de la concentration calcique extracellulaire, ni sur le potentiel membranaire, ni sur la résistance d'entrée.

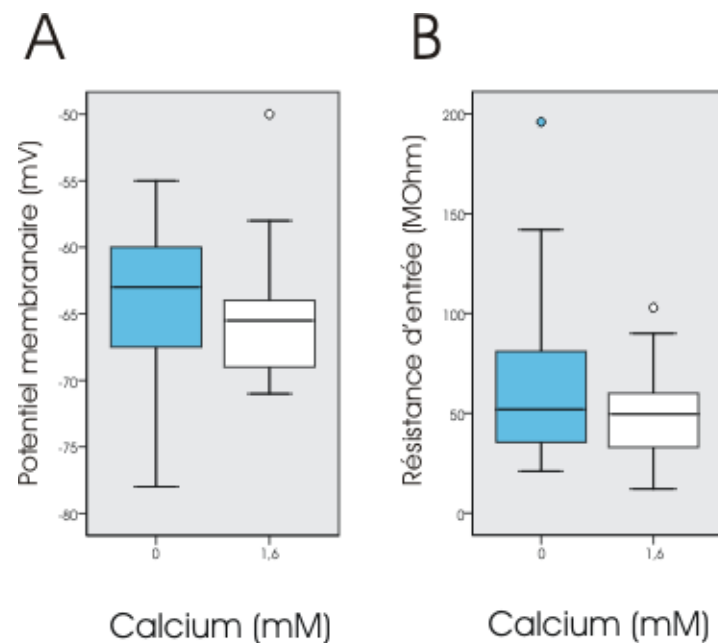


Figure 16. Boîtes à moustaches des paramètres électrophysiologiques en fonction de la concentration calcique extracellulaire. La ligne centrale représente la médiane. Les charnières de la boîte correspondent aux 25^e et 75^e centiles et les moustaches aux valeurs minimale et maximale ou 1,5 fois la hauteur des charnières de la boîte, selon ce qui est le plus près de la médiane. Les cercles représentent des valeurs éloignées. En bleu, les cellules enregistrées en absence de calcium extracellulaire ($n = 31$) et en blanc, les cellules enregistrées en présence de calcium extracellulaire (1,6 mM, $n = 14$). **A**, Potentiel membranaire de repos (mV) des cellules enregistrées. **B**, Résistance d'entrée (MOhm) des cellules enregistrées.

En effet, lorsque nous comparons le potentiel membranaire de repos moyen des groupes de cellules enregistrées en présence ou en absence de calcium extracellulaire, respectivement $-64,9 \pm 5,6$ mV et $-63,8 \pm 5,8$ mV, nous ne pouvons pas rejeter l'hypothèse nulle (test t avec 43 degrés de liberté, $p = 0,56$). De la même façon, nous n'avons pas détecté de différence significative ($p = 0,51$), entre la résistance d'entrée médiane des cellules enregistrées en présence ($50 \text{ M}\Omega$, de 12 à $103 \text{ M}\Omega$) ou en absence ($52 \text{ M}\Omega$, de 21 à $196 \text{ M}\Omega$) de calcium extracellulaire (voir Tableau III).

3.2. Effet du sens de la perfusion

Comme dans le cas du calcium extracellulaire, le sens relatif de la perfusion n'a pas d'impact significatif, sur les propriétés électrophysiologiques des astrocytes du NVsnpr-D (Figure 17). Ainsi, on ne détecte pas de différence significative (test t avec 43 degrés de liberté, $p = 0,62$) entre le potentiel membranaire de repos moyen, lorsque la perfusion va vers le centre du noyau ($-63,7 \pm 5,3$ mV) ou dans la direction contraire ($-64,6 \pm 6,1$ mV), relativement à la cellule enregistrée. De même, le sens relatif de la perfusion n'engendre pas de différences significatives sur la résistance d'entrée ($p = 0,51$); sa valeur médiane étant de $50 \text{ M}\Omega$ (de 12 à $142 \text{ M}\Omega$) lorsqu'elle est orientée vers le centre du noyau et $54 \text{ M}\Omega$ (de 23 à $196 \text{ M}\Omega$) lorsqu'elle va dans le sens opposé (Tableau IV).

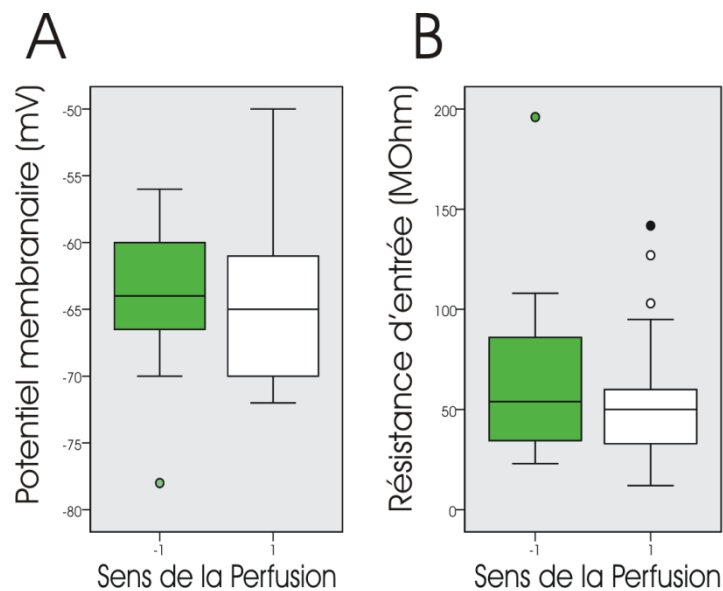


Figure 17. Boîtes à moustaches des paramètres électrophysiologiques en fonction du sens relatif de la perfusion. La ligne centrale représente la médiane. Les charnières de la boîte correspondent aux 25^e et 75^e centiles et les moustaches aux valeurs minimale et maximale ou 1,5 fois la hauteur des charnières de la boîte, selon ce qui est le plus près de la médiane. Les cercles représentent des valeurs éloignées et les points noirs des valeurs éloignées extrêmes dont les valeurs sont supérieures à trois fois la distance entre les 25^e et 75^e centiles. **A**, Potentiel membranaire de repos des cellules enregistrées. **B**, Résistance d'entrée des cellules enregistrées. Sont représentées en blanc, les cellules dont la perfusion était orientée dans la même direction (**1**) que le centre du noyau ($n=25$) et en vert, les cellules dont la perfusion était orientée dans le sens opposé (**-1**) au centre du noyau ($n=20$).

3.3. *Effet de la position*

Certaines observations peuvent être tirées de l'analyse des propriétés électrophysiologiques des astrocytes enregistrés en fonction de leur position dans le NVsnpr-D (Figure 18). D'abord, le potentiel membranaire de repos des cellules enregistrées du côté médian et plus précisément dans le cadran dorso-médian semble nettement plus dépolarisé, que celui des cellules du côté latéral du noyau (Figure 18 A_{ii}). Ensuite, nous n'observons pas de relation forte suggérant que la résistance d'entrée serait supérieure en périphérie, contrairement à ce qui pourrait être suggéré par l'idée d'une orientation préférentielle du réseau vers le centre du noyau et donc d'une diminution de la connectivité en périphérie. En effet, nous observons que la résistance d'entrée est au minimum, tant à la limite dorsale que ventrale du noyau (Figure 18 B_{ii}) et de façon plus générale, la résistance demeure inférieure à 50 MOhm tant que la distance dans l'axe dorso-ventral entre la cellule enregistrée et la bordure du noyau est inférieure à 150 μm (Figure 18 B_{iii}).

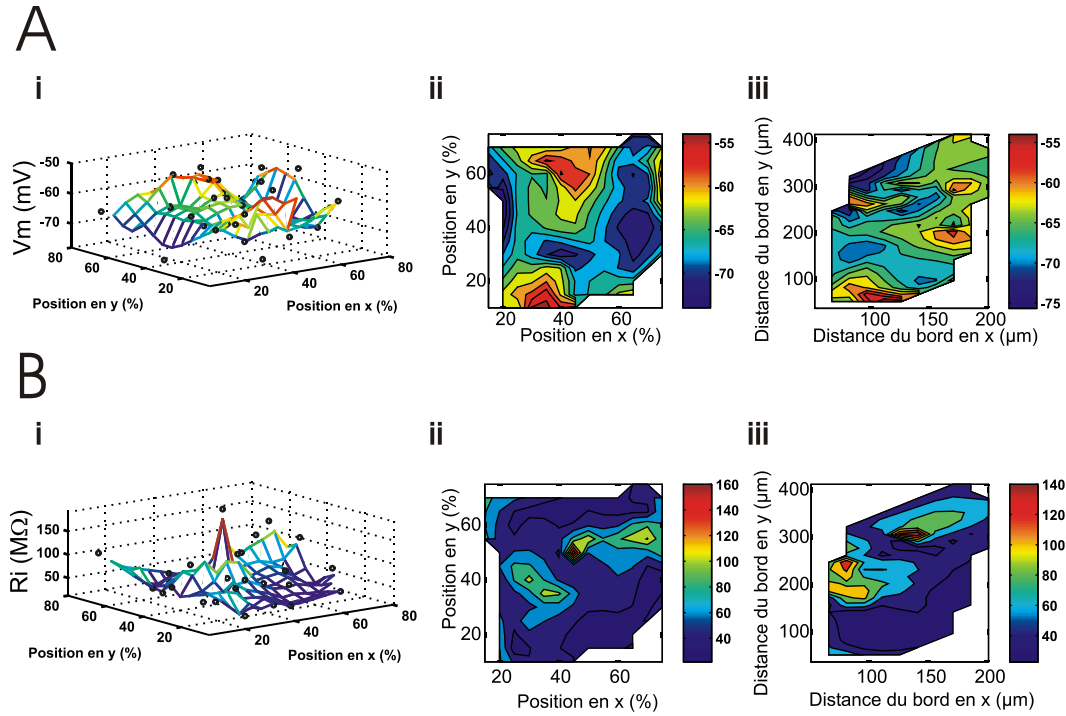


Figure 18. Interpolation des paramètres électrophysiologiques en fonction de la position dans le NVsnpr-D (n = 45). **A**, Effet de la position sur le potentiel membranaire de repos (V_m) des cellules enregistrées. **B**, Effet de la position sur la résistance d'entrée (R_i) des cellules enregistrées. La colonne de gauche **(i)** représente l'interpolation en trois dimensions des paramètres électrophysiologiques en fonction de la position relative dans le noyau. Les colonnes du centre **(ii)** et de droite **(iii)** correspondent aux représentations topographiques des surfaces obtenues par l'interpolation de la position relative dans le NVsnpr-D **(ii)** et des données exprimées en fonction de la distance (μm) de la bordure du noyau **(iii)**.

4. Connectivité des astrocytes

De nombreuses études se sont déjà intéressées à la taille du syncytium astrocytaire, mais celles-ci portaient sur différentes régions du système nerveux central. Le nombre de cellules alors observé se comptait généralement en centaines de cellules; ce qui diffère grandement de nos résultats puisque les réseaux que nous avons observés dans le NVsnpr se comptaient en dizaines, voire en guère plus de cent cellules.

Tableau V. Statistiques descriptives des paramètres caractérisant le couplage intercellulaire et test de comparaison non paramétrique U de Mann-Withney, en fonction de la concentration calcique extracellulaire.

	Calcium (mM)	n	Moyenne	SEM	Médiane	Minimum	Maximum	U de Mann-Whitney		
								U	Z	p
nombre de cellules	0	31	32	31	23	1	137	124	-2,29	0,02 *
	1,6	14	15	13	10	4	45			
Aire du Réseau (µm²)	0	31	55816	49749	35105	193	185710	126	-2,23	0,03 *
	1,6	14	22930	24002	12501	2066	86526			
NVsnpr couvert (%)	0	31	21,1	16,4	21,1	0,1	62,4	121	-2,35	0,02 *
	1,6	14	8,8	7,5	6,9	1,3	28,9			
Densité du réseau (cell/mm²)	0	31	984	227	638	294	5794	169	-1,18	0,24
	1,6	14	911	136	842	245	1935			

* p < 0,05

Tableau VI. Statistiques descriptives des paramètres caractérisant le couplage intercellulaire et test de comparaison non paramétrique de Mann-Withney (U), en fonction du sens relatif de la perfusion.

	Sens Perf	n	Moyenne	SEM	Médiane	Minimum	Maximum	U de Mann-Whitney		
								U	Z	p
Nombre de cellules	-1	20	25	3	24	1	60	205	-1,04	0,30
	1	25	28	6	14	1	137			
Aire du Réseau (μm^2)	-1	20	45 804	8422	34 511	193	121 281	225	-0,57	0,57
	1	25	45 409	10424	24 979	1 220	185 710			
NVsnpr couvert (%)	-1	20	18,1	3,0	16,2	0,1	42,9	214	-0,82	0,41
	1	25	16,6	3,4	9,9	0,8	62,4			
Densité du réseau (cell/mm²)	-1	20	911	231	668	328	5173	244	-0,14	0,89
	1	25	1003	227	650	245	5794			

4.1. Effet du calcium extracellulaire

Nous avons observé que les trois paramètres estimant la taille des réseaux témoignent de façon cohérente d'un effet de la concentration calcique extracellulaire. Ces données illustrées à la Figure 19 et présentées au Tableau V indiquent que, l'exposition à un milieu sans calcium extracellulaire induit une augmentation significative du nombre de cellules marquées ($p = 0,02$), de l'aire du réseau ($p = 0,03$) et du pourcentage de la superficie du NVsnpr-D couvert par le réseau ($p = 0,02$).

L'examen de la Figure 19 D laisse entrevoir la possibilité que trois valeurs éloignées extrêmes (points noirs) puissent masquer une différence statistiquement significative entre la densité des réseaux observés, lorsqu'enregistrés dans un milieu avec ou sans calcium.

Lorsque ces trois valeurs sont retirées de l'analyse (Figure 19 E), nous observons que la densité moyenne des réseaux enregistrés en absence de calcium extracellulaire passe de 980 à 610 cellules/mm². La différence de densité observée entre les réseaux obtenus avec et sans Ca²⁺ demeure non significative dans ces conditions, mais la probabilité de commettre une erreur de type 1, en rejetant l'hypothèse nulle passe de 0,239 à 0,067; une probabilité qui pourrait ne tenir qu'à la taille de l'échantillon et à la puissance du test non paramétrique. Cependant, afin de vérifier si un facteur externe pourrait être à l'origine de ces valeurs éloignées, d'éviter de tomber dans un raisonnement statistique circulaire (Kriegeskorte et coll. 2010, une revue) et puisque ces observations n'affectent la distribution d'aucun autre paramètre, elles n'ont pas été rejetées de l'analyse ici présente.

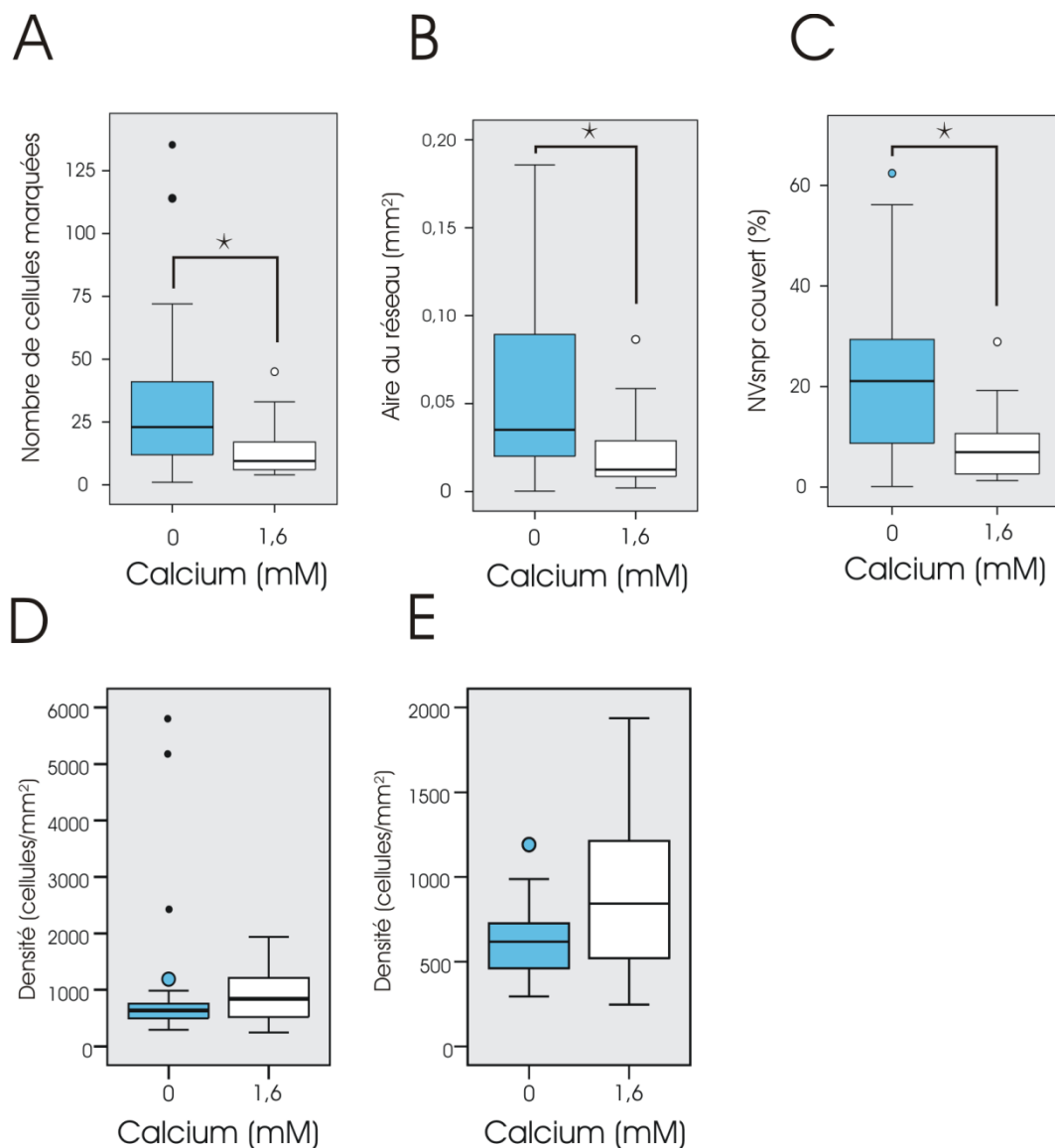


Figure 19. Boîtes à moustaches des paramètres de couplage en fonction de la concentration calcique extracellulaire. La ligne centrale représente la médiane. Les charnières de la boîte correspondent aux 25^e et 75^e centiles et les moustaches aux valeurs minimale et maximale ou 1,5 fois la hauteur des charnières de la boîte, selon ce qui est le plus près de la médiane. Les cercles représentent des valeurs éloignées et les points noirs des valeurs éloignées extrêmes dont les valeurs sont supérieures à trois fois la distance entre les 25^e et 75^e centiles. En bleu, les cellules enregistrées en absence de calcium extracellulaire (n= 31) et en blanc, les cellules enregistrées en présence de calcium extracellulaire (1,6 mM, n= 14). **A**, Nombre de cellules marquées, au sein des réseaux. **B**, Aire des réseaux (mm²). **C**, Proportion du NVsnpr-D couvert par chacun des réseaux (%). **D**, Densité cellulaire des réseaux (cellules/mm²). **E**, Densité cellulaire des réseaux (cellules/mm²), après avoir retiré les trois valeurs éloignées extrêmes supérieures à 2000 cellules/mm².

4.2. *Effet du sens de la perfusion*

Contrairement à la concentration calcique extracellulaire, le sens de la perfusion n'a pas d'effet significatif sur la connectivité des astrocytes (voir Tableau VI et Figure 20). Ainsi, lorsque l'on compare les deux groupes de cellules où le sens de la perfusion va dans le même sens ou dans le sens opposé au centre du noyau, le nombre de cellules marquées est respectivement de 14 cellules (de 1 à 137 cellules) et 24 cellules (de 1 à 60 cellules), l'aire du réseau de 24 979 μm^2 (de 1220 à 185 710 μm^2) et 34 511 μm^2 (de 193 à 121 281 μm^2) et enfin, le pourcentage de la surface du NVsnpr couvert par le réseau de 9,9 % (de 0,8 à 62,4 %) et 16,2% (de 0,1 à 42,0 %); aucune de ces trois paires de valeurs n'arbore de différences significatives (respectivement $p=0,30$ $p=0,57$ et $p=0,41$). La densité cellulaire du réseau ne présente pas la même ambiguïté que dans le cas de la concentration calcique extracellulaire et ne se trouve pas non plus influencée par le sens de la perfusion ($p=0,89$), la densité observée étant de 650 cellules/ mm^2 (de 250 à 5 790 cellules/ mm^2) et de 670 cellules/ mm^2 (de 330 à 5 170 cellules/ mm^2), lorsque la perfusion va respectivement vers ou dans le sens opposé au centre du noyau (voir Tableau VI).

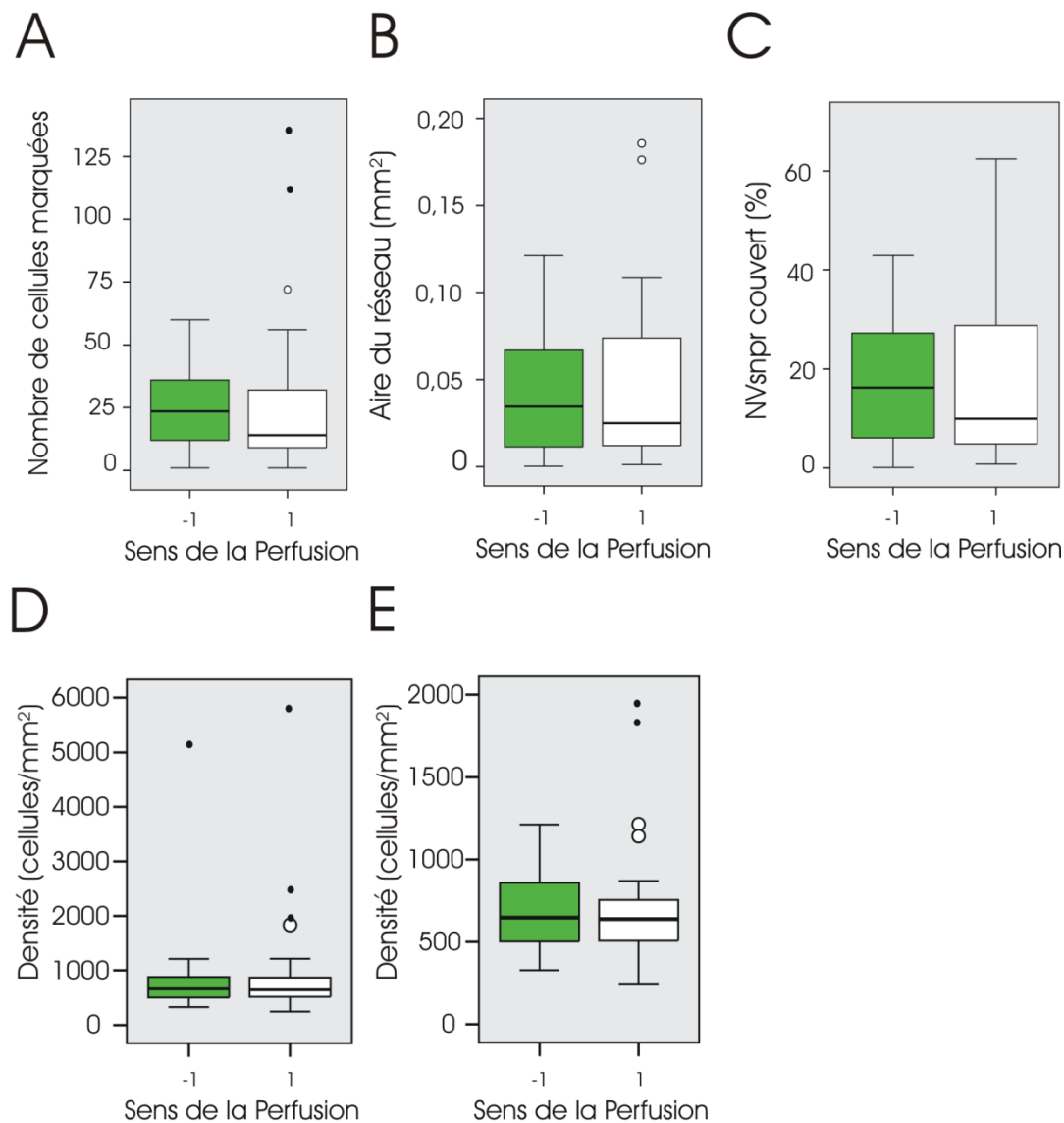


Figure 20. Boîtes à moustaches des paramètres de couplage en fonction du sens de la perfusion. La ligne centrale représente la médiane. Les charnières de la boîte correspondent aux 25^e et 75^e centiles et les moustaches aux valeurs minimale et maximale ou 1,5 fois la hauteur des charnières de la boîte, selon ce qui est le plus près de la médiane. Les cercles représentent des valeurs éloignées et les points noirs des valeurs éloignées extrêmes dont les valeurs sont supérieures à trois fois la distance entre les 25^e et 75^e centiles. **A**, Nombre de cellules marquées, au sein des réseaux. **B**, Aire des réseaux (mm²). **C**, Proportion du NVsnpr-D couvert par chacun des réseaux (%). **D**, Densité cellulaire des réseaux (cellules/mm²). **E**, Densité cellulaire des réseaux (cellules/mm²), après avoir retiré les trois valeurs éloignées extrêmes supérieures à 2000 cellules/mm². Sont représentées en blanc, les cellules dont la perfusion était orientée dans la même direction (1) que le centre du noyau (n=25) et en vert, les cellules dont la perfusion était orientée dans le sens opposé (-1) au le centre du noyau (n=20).

4.3. *Effet de la position*

Comme dans le cas du potentiel membranaire de repos, le centre du NVsnpr-D, le cadran dorso-médian et dans une moindre mesure le cadran ventro-médian présente des réseaux de taille considérablement plus importante, que ceux émergeant des cadrans latéraux (Figure 21 A_{ii}-C_{ii}). D'ailleurs, outre une importance plus grande de la couverture relative du NVsnpr-D par le réseau, dans le cadran ventro-médian (Figure 21 C_{ii}), les trois paramètres évaluant la taille du syncytium astrocytaire arguent pour un effet de la position sur la taille du réseau (Figure 21 A-C). Le fait que ces résultats vont tous dans le même sens, indiquent de plus que les deux facteurs pouvant influencer différemment ces trois paramètres (la densité cellulaire du réseau et la variation de la taille du NVsnpr-D) n'ont pas d'effet dominant sur la relation entre la taille du réseau astrocytaire et la position de la cellule enregistrée dans le NVsnpr-D.

De même, conformément à l'idée d'une orientation préférentielle des réseaux, vers le centre du NVsnpr-D, selon laquelle la connectivité entre les astrocytes serait inférieure en périphérie, la transposition de la position des cellules en termes de distance (en μm) de la bordure du NVsnpr-D, nous permet de mettre en lumière la très forte relation existant entre la distance de la bordure du noyau et les trois paramètres illustrant la taille du réseau (Figure 21 A_{iii}-C_{iii}). En effet, à l'exception d'un ilot isolé qui se trouve à moins de 100 μm de la bordure dans les axes x et y, où les réseaux couvrent plus de 30 % du NVsnpr-D (Figure 21 C_{iii}), nous observons une augmentation importante de la connectivité des astrocytes à mesure qu'ils s'éloignent de la bordure, dans les deux axes (Figure 21 A_{iii}-C_{iii}).

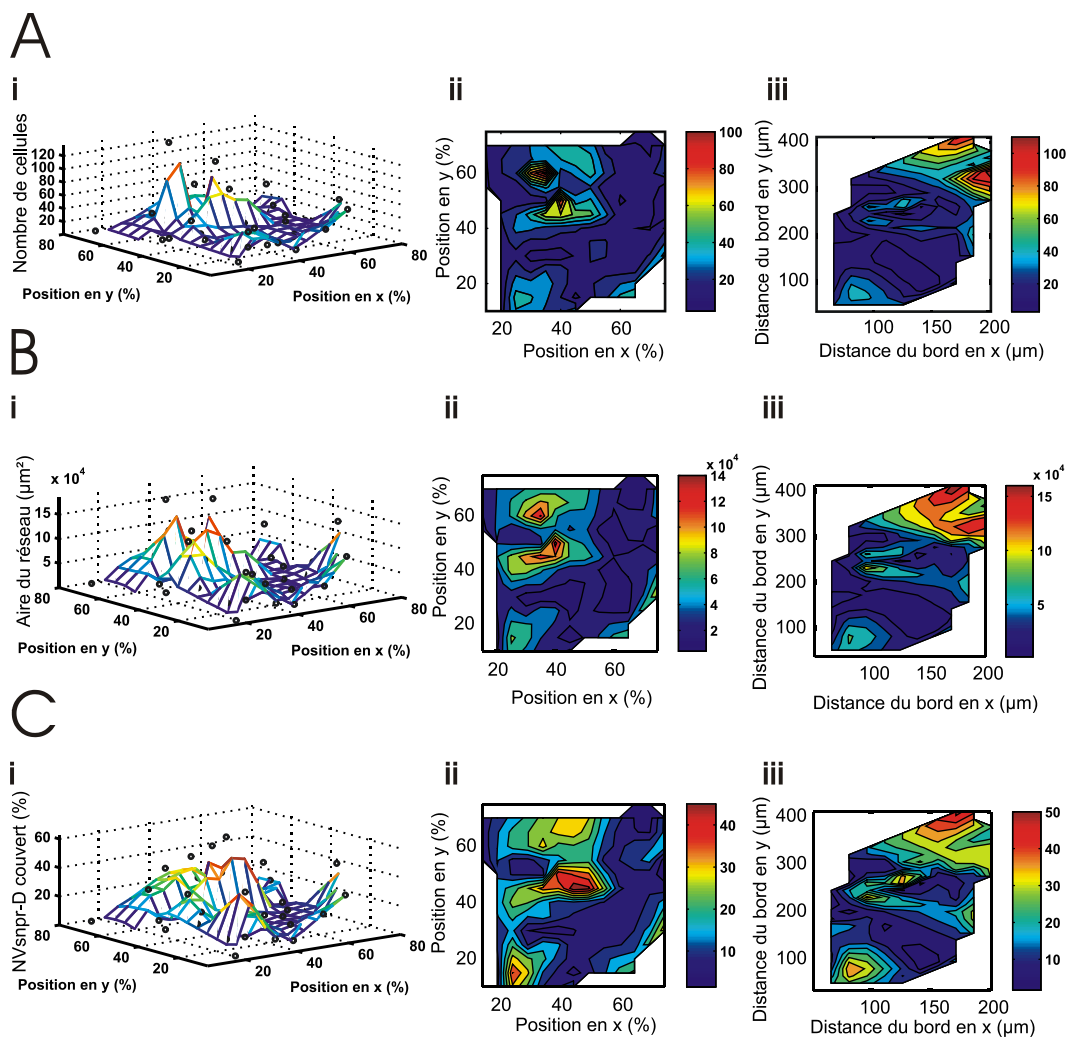


Figure 21. Interpolation des paramètres de connectivité en fonction de la position dans le NVsnpr-D ($n = 45$). **A**, Effet de la position sur le nombre de cellules marquées au sein chaque réseau. **B**, Effet de la position sur l'aire des réseaux (μm^2). **C**, Effet de la position sur la proportion du NVsnpr-D couverte par le réseau (%). **D**, Effet de la position sur la densité cellulaire des réseaux (cellules/ mm^2). La colonne de gauche (i) représente l'interpolation en trois dimensions des paramètres de couplage, en fonction de la position relative dans le noyau. Les colonnes du centre (ii) et de droite (iii) correspondent aux représentations topographiques des surfaces obtenues par l'interpolation de la position relative dans le NVsnpr-D (ii) et des données exprimées en fonction de la distance (μm) de la bordure du noyau (iii).

L'interpolation de la densité cellulaire des réseaux en fonction de leur position dans le noyau nous permet d'observer une des caractéristiques des valeurs éloignées extrêmes précédemment évoquées. En effet, l'examen de la Figure 22 A montre que les cellules dont proviennent ces valeurs sont situées en marge du réseau, dans les coins ventro-médian et dorso-latéral; à moins de 50 μ m de la bordure, dans l'axe x. Ces trois valeurs masquant toute la variabilité observée dans la densité cellulaire des réseaux, nous les avons retirées afin de mieux apprécier l'effet de la position dans le NVsnpr-D, sur la densité cellulaire de l'ensemble des réseaux. La Figure 22 B, nous permet de réitérer les observations faites sur les valeurs éloignées, les maxima locaux étant de nouveau situés en périphérie du noyau, ventralement et dans le coin dorso-latéral, à environ 100 μ m de la bordure, selon l'axe des y. La densité cellulaire des réseaux en fonction de la position relative dans le NVsnpr-D (Figure 22 B_{ii}) semble négativement corrélée à la taille des réseaux et donne l'image inverse de celles obtenues pour le nombre de cellules marquées, l'aire de la surface du réseau et la proportion du NVsnpr-D couvert par le réseau (Figure 21 A_{ii}-C_{ii}).

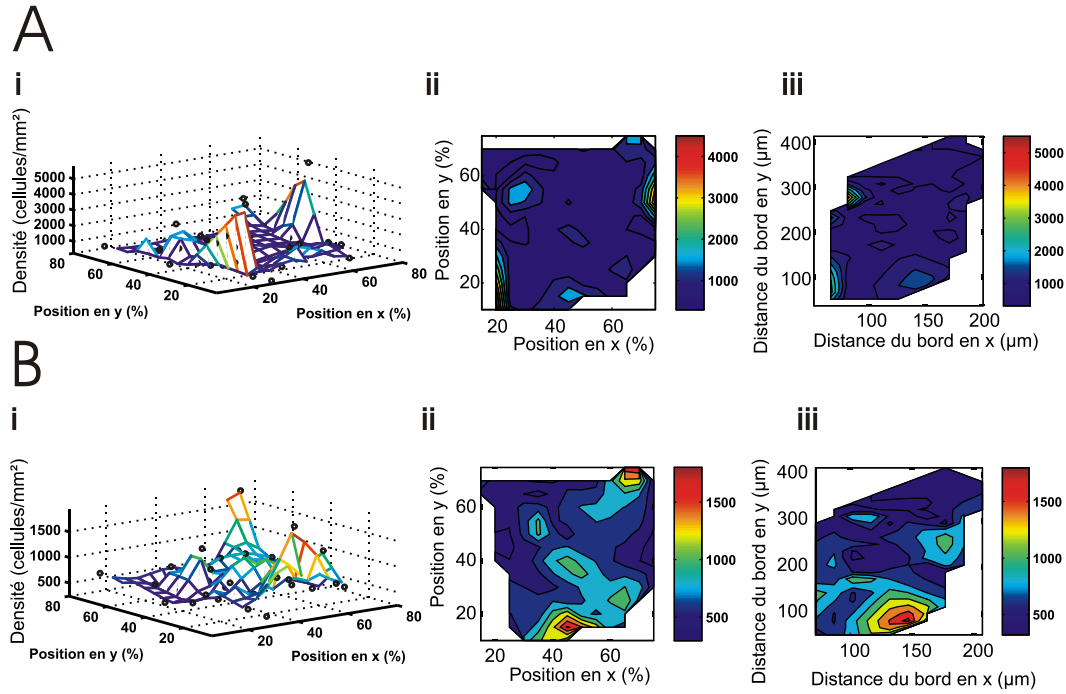


Figure 22. Interpolation de la densité des réseaux (cellules/mm²) en fonction de la position de la cellule enregistrée, dans le NVsnpr-D. **A**, Effet de la position sur la densité cellulaire en conservant les trois valeurs éloignées extrêmes ($n = 45$). **B**, Effet de la position sur la densité cellulaire après avoir retiré les trois valeurs éloignées extrêmes ($n = 42$). La colonne de gauche (**i**) représente l'interpolation en trois dimensions des paramètres de couplage, en fonction de la position relative dans le noyau. Les colonnes du centre (**ii**) et de droite (**iii**) correspondent aux représentations topographiques des surfaces obtenues par l'interpolation de la position relative (%) dans le NVsnpr-D (**ii**) et des données exprimées en fonction de la distance (μm) de la bordure du noyau (**iii**).

5. Excentricité et orientation du syncytium astrocytaire

Le NVsnpr n'est pas une structure géométriquement simple comme la colonne d'un barillet du cortex somatosensoriel, où une orientation peut être légitimement exprimée selon un système d'axes simple et absolu (Houades et coll., 2008). Pour y caractériser l'orientation du vecteur moyen des réseaux, nous avons donc eu recours à un référentiel relatif à chaque cellule enregistrée : le vecteur la liant au centre du NVsnpr-D théorique.

En résulte une distribution de la différence angulaire (exprimée entre -180 et 180°), que l'on ne peut distinguer d'une distribution gaussienne centrée à 0° (voir Figure 23 A, n=45, Z de Kolmogorov de 0,453 et signification asymptotique bilatérale = 0,986). Les données d'orientation proviennent par nature de dimensions circulaires, cette comparaison doit alors être prise avec précautions. Des considérations statistiques doivent en effet alors être prises en compte, car même une simple moyenne donne alors des résultats incohérents. De plus, le fait d'utiliser un référentiel relatif élimine la dimension stéréotaxique de la direction de l'orientation préférentielle, celle-ci ne pouvant plus être traduite en terme d'axe ventro-dorsal ou médio-latéral et n'atteste donc plus que de l'importance de la divergence entre la direction de ce vecteur et le centre du noyau. Le signe de l'orientation exprimée entre -180 et 180° perd alors tout son sens. Nous avons donc transformé les données d'orientation préférentielle pour en obtenir la valeur absolue (différence angulaire absolue, exprimée entre 0 et 180°). Cette transformation nous libère des contraintes liées aux données circulaires et nous permet alors de comparer légitimement l'orientation préférentielle retrouvée au sein des groupes formés par les différentes modalités de calcium extracellulaire ou de sens de la perfusion

(Tableaux VII et VIII). Nous pouvons également attester de la non-uniformité de la distribution de la direction de la résultante des réseaux (Figure 23 A ii, $n=45$, Z de Kolmogorov de 1,862 et signification asymptotique bilatérale = 0,002), confirmant ainsi que l'orientation préférentielle du réseau n'est pas purement le fruit du hasard.

Tableau VII. Statistiques descriptives des paramètres associés à l'orientation du réseau et test de comparaison non paramétrique U de Mann-Withney, en fonction de la concentration calcique extracellulaire.

	Calcium (mM)	n	Moyenne	SEM	Médiane	Minimum	Maximum	U de Mann-Whitney		
								U	Z	P
Aspect Ratio	0	31	1,79	0,59	1,69	1,04	3,29	215	-0,05	0,96
	1,6	14	1,78	0,58	1,73	1,17	3,61			
Résultante Normalisée (μm)	0	31	57,2	53,0	34,7	1,0	190,7	185	-0,78	0,43
	1,6	14	34,7	22,7	26,5	6,1	72,7			
Différence angulaire [-180,180]	0	31	-13,1	14,1	-19,1	-161,3	143,6	214	-0,07	0,94
	1,6	14	-22,0	22,4	19,9	-167,5	93,0			
Différence angulaire [0,180]	0	31	61,6	8,9	43,7	2,4	161,3	182	-0,86	0,39
	1,6	14	69,1	13,0	52,8	18,5	167,5			

Tableau VIII. Statistiques descriptives des paramètres associés à l'orientation du réseau et test de comparaison non paramétrique de Mann-Withney (U), en fonction du sens relatif de la perfusion.

	Sens Perf	n	Moyenne	SEM	Médiane	Minimum	Maximum	U de Mann-Whitney		
								U	Z	p
Aspect Ratio	-1	20	1,76	0,60	1,49	1,04	3,06	227	-0,53	0,60
	1	25	1,81	0,57	1,72	1,17	3,61			
Resultante Normalisée (µm)	-1	20	55,7	47,6	43,7	2,2	190,7	211	-0,89	0,37
	1	25	45,9	46,5	24,7	1,0	186,1			
Différence angulaire [-180,180]	-1	20	9,3	68,1	5,4	-97,1	143,6	173	-1,76	0,08
	1	25	-36,1	83,2	-27,8	-167,5	121,9			
Différence angulaire [0,180]	-1	20	54,2	9,0	42,2	5,3	143,6	209	-0,94	0,35
	1	25	71,7	10,8	55,6	2,4	167,5			

En revanche, un vecteur est défini par la combinaison d'une direction et d'une norme alors que l'analyse de la direction de l'orientation préférentielle ne tient pas compte de l'importance relative de chaque vecteur, attribuant un même poids à l'orientation de vecteur moyen de réseaux dont la norme est très grande ou à toutes fins pratiques inexistante, mais ayant tout de même une orientation. Ceci pourrait remettre en question la signification fonctionnelle de l'observation d'une différence angulaire absolue se distinguant d'une distribution uniforme, s'il s'avérait que la norme des vecteurs résultants, à l'origine de l'orientation dominante, soit de taille inférieure. Nous avons utilisé deux approches pour éclaircir ce problème. Nous avons d'abord procédé à l'analyse des vecteurs entiers, en observant la relation entre la norme des vecteurs et la différence angulaire absolue (Figure 23 B_i et B_{ii}), puis en regroupant les vecteurs selon

leur cadran d'origine au sein du NVsnpr-D et en procédant à une moyenne vectorielle de la résultante pour chaque cadran (Figure 24). Nous observons alors que loin d'être inférieure, l'importance de l'orientation préférentielle des vecteurs diminue à mesure que leur différence angulaire absolue diverge de 0° (Figure 23 B) et que dans chaque cadran du NVsnpr-D, le vecteur moyen est orienté vers le centre du noyau (Figure 24). De plus, les réseaux restent en très grande majorité confinés à l'intérieur du NVsnpr-D (Figure 24).

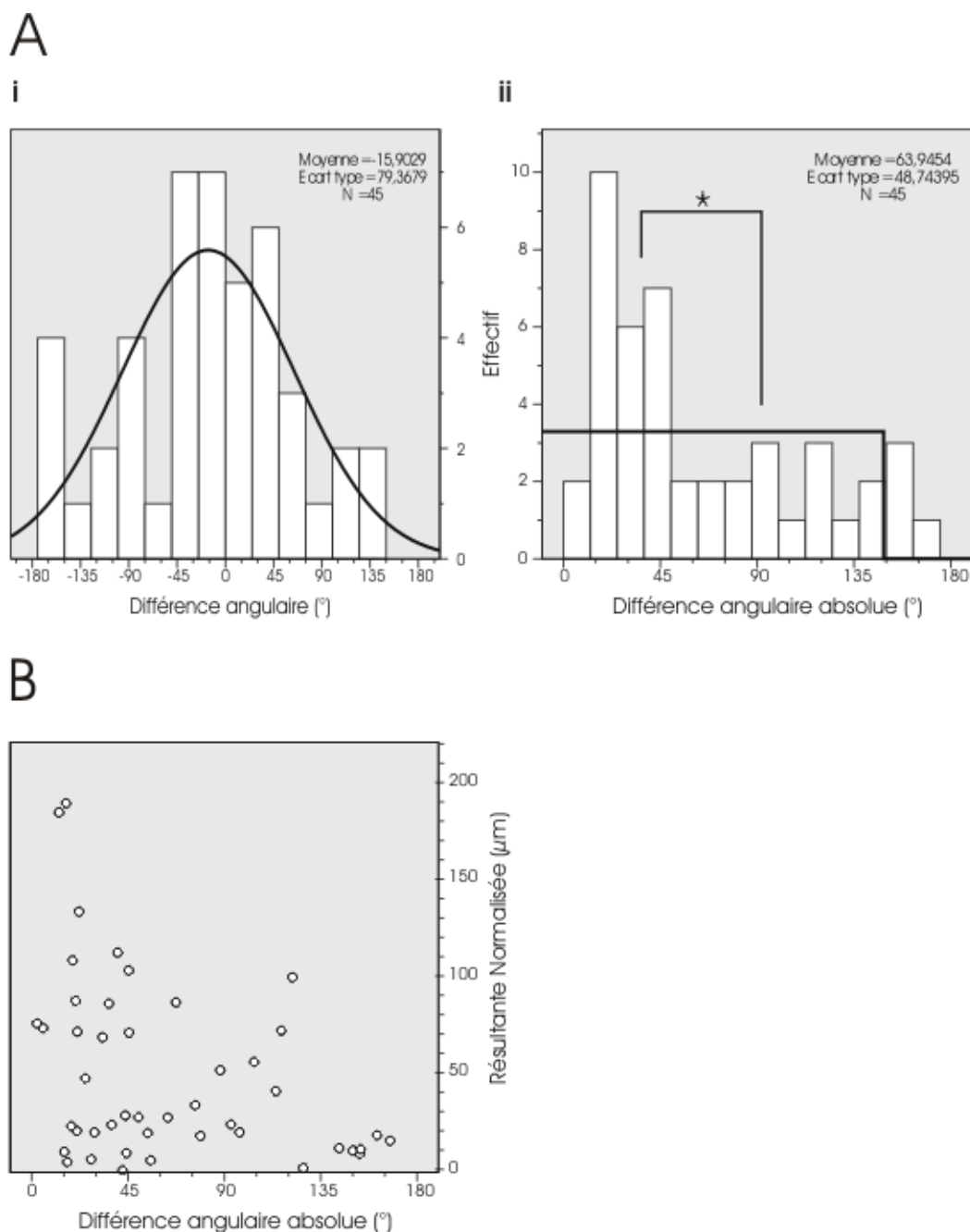


Figure 23. Distribution et importance de l'orientation préférentielle ($n = 45$). **A**, Distribution de l'orientation préférentielle. Le panneau de gauche (**i**) illustre la comparaison entre la distribution observée de la différence angulaire (°) et une courbe gaussienne. Le panneau de droite (**ii**) démontre la non-uniformité (Kolmogorov-Smirnov pour un échantillon, $p < 0,01$) de la distribution de l'orientation préférentielle, lorsqu'elle est exprimée par la différence angulaire absolue. **B**, Importance de l'orientation préférentielle en fonction de sa direction, lorsqu'elle est exprimée par la différence angulaire absolue (0 à 180°).

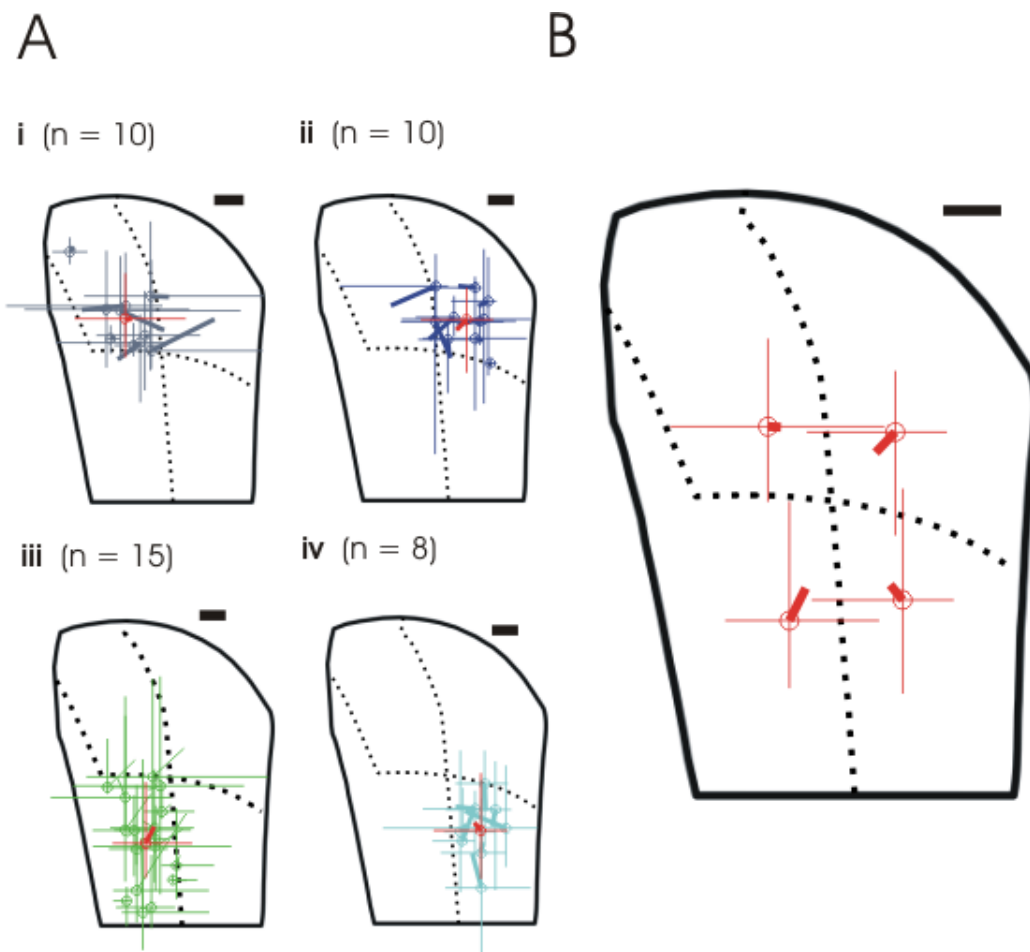


Figure 24. Classification des réseaux en fonction de leur position dans le NVsnpr-D et moyenne de l'orientation préférentielle des réseaux. **A**, Les panneaux **i**, **ii**, **iii** et **iv** rassemblent par cadrans les réseaux en fonction de la position relative, dans le NVsnpr-D, de la cellule dont ils émergent. Ces cadrans y sont définis par les axes représentant 50% de la hauteur et de la largeur (en pointillé). Les panneaux **i**, **ii**, **iii** et **iv** représentent les réseaux individuels dans les cadrans dorso-médian (gris), dorso-latéral (bleu), ventro-médian (vert) et ventro-latéral (cyan). Les réseaux y sont représentés par la position de la cellule enregistrée (cercle), la hauteur et la largeur du réseau (croix) et l'importance ainsi que la direction de l'orientation préférentielle du réseau (vecteur plus épais ayant comme origine la cellule enregistrée). Pour chacun de ces cadrans, nous avons représenté les moyennes (en rouge) de la position des cellules enregistrées, de la hauteur et de la largeur des réseaux, ainsi que la moyenne vectorielle de l'orientation préférentielle des réseaux. **B**, Moyenne de la position, de la hauteur et de la largeur relatives ainsi que de l'orientation préférentielle, de chacun des cadrans du NVsnpr-D. Les échelles sont d'une longueur de 100 μm .

5.1. *Effet du calcium extracellulaire*

Comme le mettent en lumière le Tableau VII et la Figure 25, la segmentation des observations en fonction de la concentration calcique extracellulaire ne semble pas occasionner d'impact significatif, ni sur la forme, ni sur l'orientation du réseau astrocytaire, au sein du NVsnpr-D.

Ainsi, nous avons observé que la surface des réseaux enregistrés, tant en présence qu'en absence de calcium extracellulaire, présente une forme oblongue, ne se distinguant pas significativement dans l'une et l'autre des conditions ($p = 0,96$). En effet, les réseaux médians dans ces groupes respectifs sont caractérisés par un aspect ratio de 1,73 (de 1,17 à 3,61) et 1,69 (de 1,04 à 3,29).

De plus, l'importance de l'orientation préférentielle (en μm) ne se distingue pas significativement l'une de l'autre; ces réseaux étant caractérisés par une résultante normalisée médiane de 26,5 μm (de 6,1 à 72,7 μm) en présence et 34,7 μm (de 1,0 à 190 μm) en absence de calcium extracellulaire.

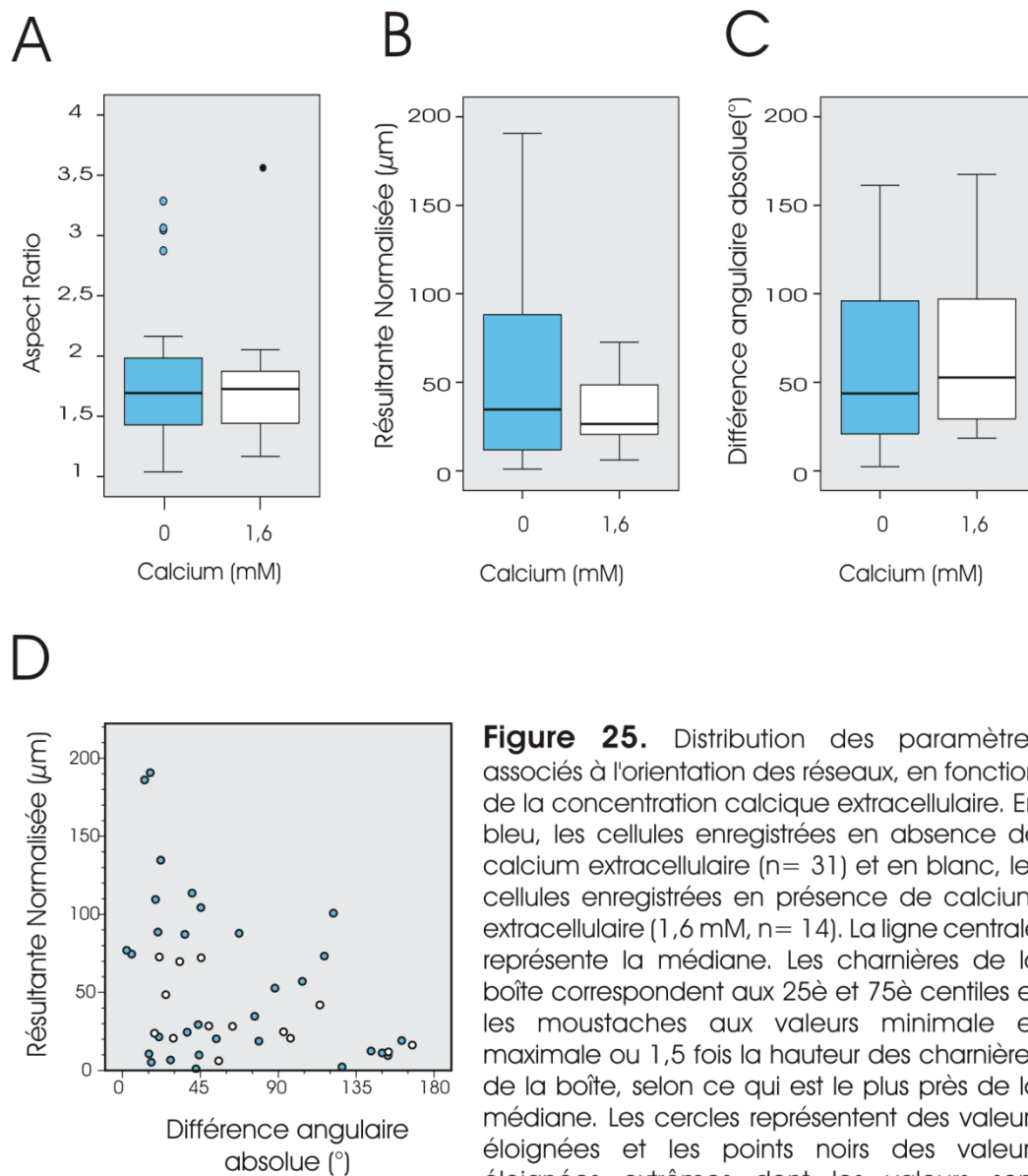


Figure 25. Distribution des paramètres associés à l'orientation des réseaux, en fonction de la concentration calcique extracellulaire. En bleu, les cellules enregistrées en absence de calcium extracellulaire ($n=31$) et en blanc, les cellules enregistrées en présence de calcium extracellulaire (1,6 mM, $n=14$). La ligne centrale représente la médiane. Les charnières de la boîte correspondent aux 25^e et 75^e centiles et les moustaches aux valeurs minimale et maximale ou 1,5 fois la hauteur des charnières de la boîte, selon ce qui est le plus près de la médiane. Les cercles représentent des valeurs éloignées et les points noirs des valeurs éloignées extrêmes dont les valeurs sont supérieures à trois fois la distance entre les 25^e et 75^e centiles. **A**, Boîtes à moustaches de l'excentricité de la surface des réseaux (Aspect Ratio). **B**, Boîtes à moustaches de la taille de la résultante normalisée (μm), témoignant de l'importance de l'orientation préférentielle des réseaux. **C**, Boîtes à moustaches de l'orientation préférentielle, relativement au centre du NVsnpr-D (exprimée entre 0 et 180 $^\circ$). **D**, Relation entre l'importance et la direction de l'orientation préférentielle.

Tant en présence qu'en absence de calcium extracellulaire, nous ne pouvons distinguer la distribution de la différence angulaire de celle d'une courbe gaussienne (Kolmogorov-Smirnov à un échantillon; $n= 14$ et 31 ; signification asymptotique bilatérale de $0,312$ et $0,803$). Plus précisément, la différence angulaire ne diffère pas significativement de 0° (test de T pour mesure unique avec 13 et 30 degrés de liberté; signification asymptotique bilatérale de $0,343$ et $0,360$). Aussi, si la valeur absolue de la différence angulaire diffère significativement d'une distribution uniforme pour les cellules enregistrées en absence de calcium extracellulaire (Kolmogorov-Smirnov à un échantillon; $n= 31$; signification asymptotique bilatérale de $0,005$), nous ne sommes pas en mesure de corroborer cette observation chez les cellules enregistrées en présence de calcium extracellulaire (Kolmogorov-Smirnov à un échantillon; $n= 14$; signification asymptotique bilatérale de $0,078$). Cependant, nous ne pouvons pas non plus observer de différence significative dans la différence angulaire absolue entre ces groupes (U de Mann-Whithney, signification asymptotique bilatérale de $0,39$).

En somme, nous n'avons observé d'effet significatif du calcium extracellulaire sur aucun des paramètres de l'orientation préférentielle (Tableau VII et Figure 25). Pourtant, classer les cellules en fonction de la concentration calcique extracellulaire et illustrer la relation entre la résultante normalisée et la différence angulaire absolue (pareillement à la Figure 23 B_{ii}), nous permet d'observer que la taille maximale des vecteurs diminue, dans les deux conditions, à mesure que l'orientation préférentielle diverge d'une orientation de 0° , mais que la taille maximale des vecteurs est bien supérieure, chez les cellules enregistrées en absence de calcium extracellulaire (Figure 25 D).

5.2. *Effet du sens de la perfusion*

Comme le mettent en lumière le Tableau VIII et la Figure 26, le sens relatif de la perfusion, en allant vers le centre du NVsnpr-D ou en direction opposée, ne semble pas occasionner d'impact significatif ni sur la forme, ni sur l'orientation du réseau astrocytaire, au sein du NVsnpr-D.

Ainsi, nous avons observé que, tout comme pour le calcium extracellulaire, peu importe le sens de la perfusion, la surface des réseaux enregistrés présente une forme allongée, ne se distinguant pas significativement l'une de l'autre ($p = 0,60$). En effet, les réseaux médians dans ces groupes respectifs sont caractérisés par un aspect ratio de 1,49 (de 1,04 à 3,06) et 1,72 (de 1,17 à 3,61).

De plus, l'importance de l'orientation préférentielle (en μm) ne se distingue pas significativement l'une de l'autre; ces réseaux étant caractérisés par une résultante normalisée médiane de 43,7 μm (de 2,2 à 190,7 μm) et 24,7 (de 1,0 à 186,1 μm), selon que la perfusion va contre ou vers le centre du NVsnpr-D.

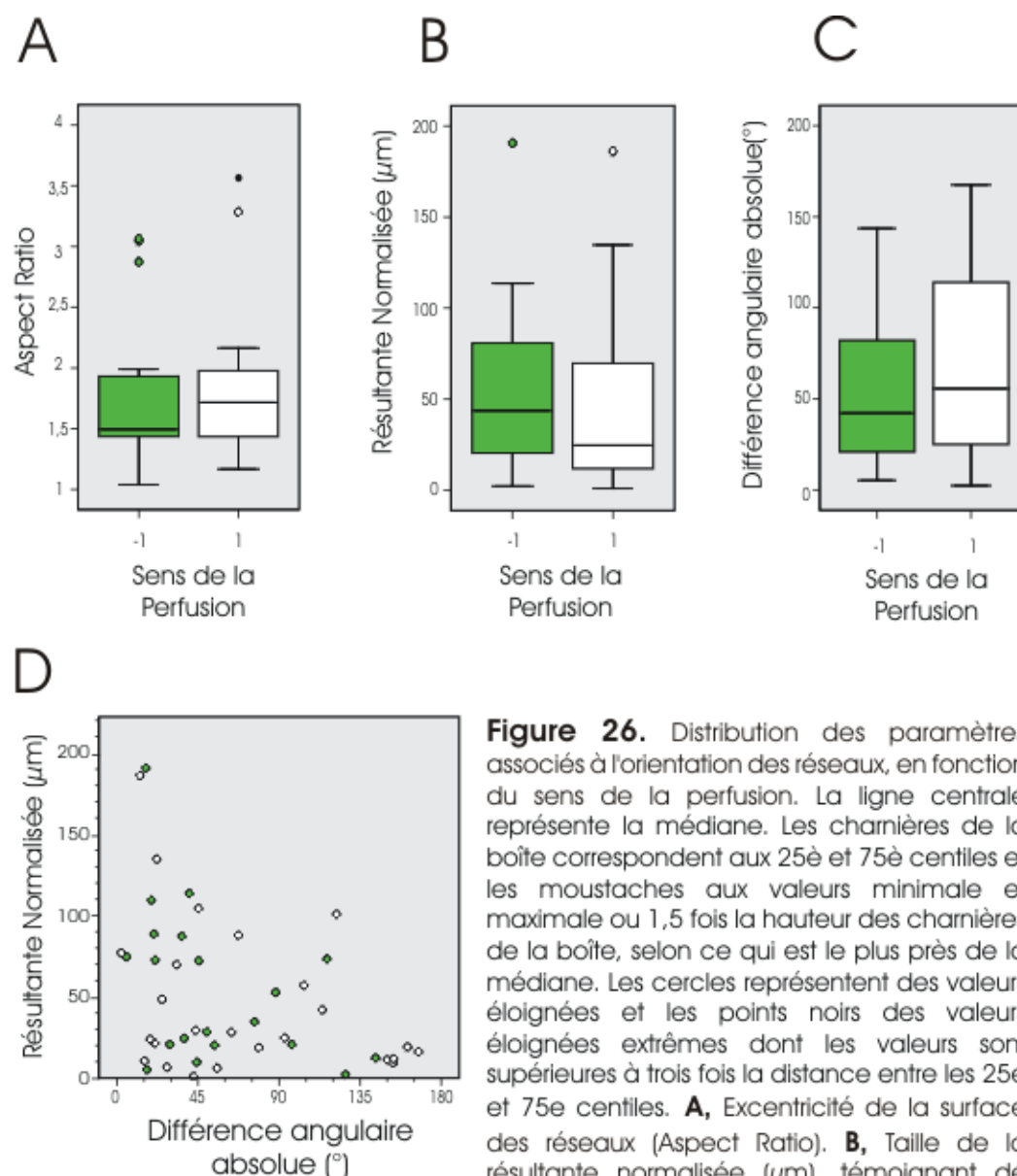


Figure 26. Distribution des paramètres associés à l'orientation des réseaux, en fonction du sens de la perfusion. La ligne centrale représente la médiane. Les charnières de la boîte correspondent aux 25^e et 75^e centiles et les moustaches aux valeurs minimale et maximale ou 1,5 fois la hauteur des charnières de la boîte, selon ce qui est le plus près de la médiane. Les cercles représentent des valeurs éloignées et les points noirs des valeurs éloignées extrêmes dont les valeurs sont supérieures à trois fois la distance entre les 25^e et 75^e centiles. **A**, Excentricité de la surface des réseaux (Aspect Ratio). **B**, Taille de la résultante normalisée (μm), témoignant de l'importance de l'orientation préférentielle des réseaux. **C**, Direction du vecteur correspondant à l'orientation préférentielle des réseaux, par rapport au centre relatif du NVsnpr-D théorique (exprimée entre 0 et 180°). **D**, Relation entre l'importance et la direction de l'orientation préférentielle. Sont représentées en blanc, les cellules dont la perfusion était orientée dans la même direction (1) que le centre du noyau (n=25) et en vert, les cellules dont la perfusion était orientée dans le sens opposé (-1) au centre du noyau (n = 20).

Comme ce qui a été observé pour l'effet de la variation de la concentration calcique extracellulaire, nous ne pouvons pas distinguer la distribution de la différence angulaire de celle d'une gaussienne, lorsque la perfusion va dans le même sens ou dans le sens opposé, au centre du noyau (respectivement $p = 0,899$ et $p = 0,981$, test de Kolmogorov-Smirnov pour un échantillon). Aussi, lorsque l'on compare la différence angulaire des deux groupes classés selon le sens de la perfusion, nous obtenons un seuil de signification asymptotique bilatéral de 0,056 (U de Mann-Whitney); qui, bien qu'inférieur au seuil de signification critique, mérite à tout le moins d'être souligné, surtout dans le cadre d'un test non paramétrique. De plus, si la distribution de la différence angulaire absolue se distingue significativement d'une distribution uniforme, lorsque la perfusion est dirigée dans le sens opposé au centre du noyau (Kolmogorov-Smirnov pour un échantillon, $p = 0,016$), nous ne pouvons cependant pas détecter cette différence, lorsque la perfusion va vers le centre du noyau (Kolmogorov-Smirnov pour un échantillon, $p = 0,177$). Cependant, pour des considérations évoquées précédemment, la différence angulaire exprimée entre -180 et 180° ne nous permet pas de comparer légitimement les deux groupes. Pour ce faire, nous devons utiliser la différence angulaire absolue, qui elle ne diffère pas significativement entre ces groupes (U de Mann-Whitney, $p = 0,35$).

En somme, nous n'avons pas observé d'effets significatifs causés par le sens relatif de la perfusion, sur les différents paramètres de l'orientation préférentielle des réseaux (Tableau VIII et Figure 26). De même, contrairement au calcium à la Figure 25 D, la représentation de la résultante normalisée en fonction de la différence angulaire absolue

et du sens de la perfusion ne crée aucune ambiguïté, les deux groupes de cellules se superposant parfaitement (Figure 26 D).

5.3. *Effet de la position*

L'interpolation des paramètres associés à l'orientation des réseaux, en fonction de la position dans le noyau, permet quelques observations intéressantes. Notamment, nous avons observé que les réseaux les plus allongés (aspect ratio élevé) sont formés d'un nombre de cellules inférieur. En effet, l'aspect ratio atteint des maxima locaux en périphérie, le long de la bordure médiane du noyau et dans le cadran ventro-latéral (Figure 27 A_{ii}), ces maxima correspondant aux minima locaux observés pour les paramètres illustrant la taille du réseau (Figure 21 A_{ii} - C_{ii}). Nous avons aussi observé que l'importance de l'orientation préférentielle ou la norme du vecteur moyen est à son maximum en périphérie, dans le coin ventro-médian du NVsnpr-D (Figure 27 B_{ii} et B_{iii}) et que dans cette même région, l'orientation préférentielle est dirigée vers le centre du noyau (Figure 27 C_{ii}). Enfin, si nous avons observé que les réseaux émergeant de cellules enregistrées à moins de 100 μm de la bordure sont orientés vers le centre du NVsnpr-D (Figure 27 C_{iii}), nous ne notons par contre pas de patrons clairs pouvant expliquer la distribution de la différence angulaire absolue selon la position des cellules enregistrées au sein du NVsnpr-D (Figure 27 C_{ii} et C_{iii}).

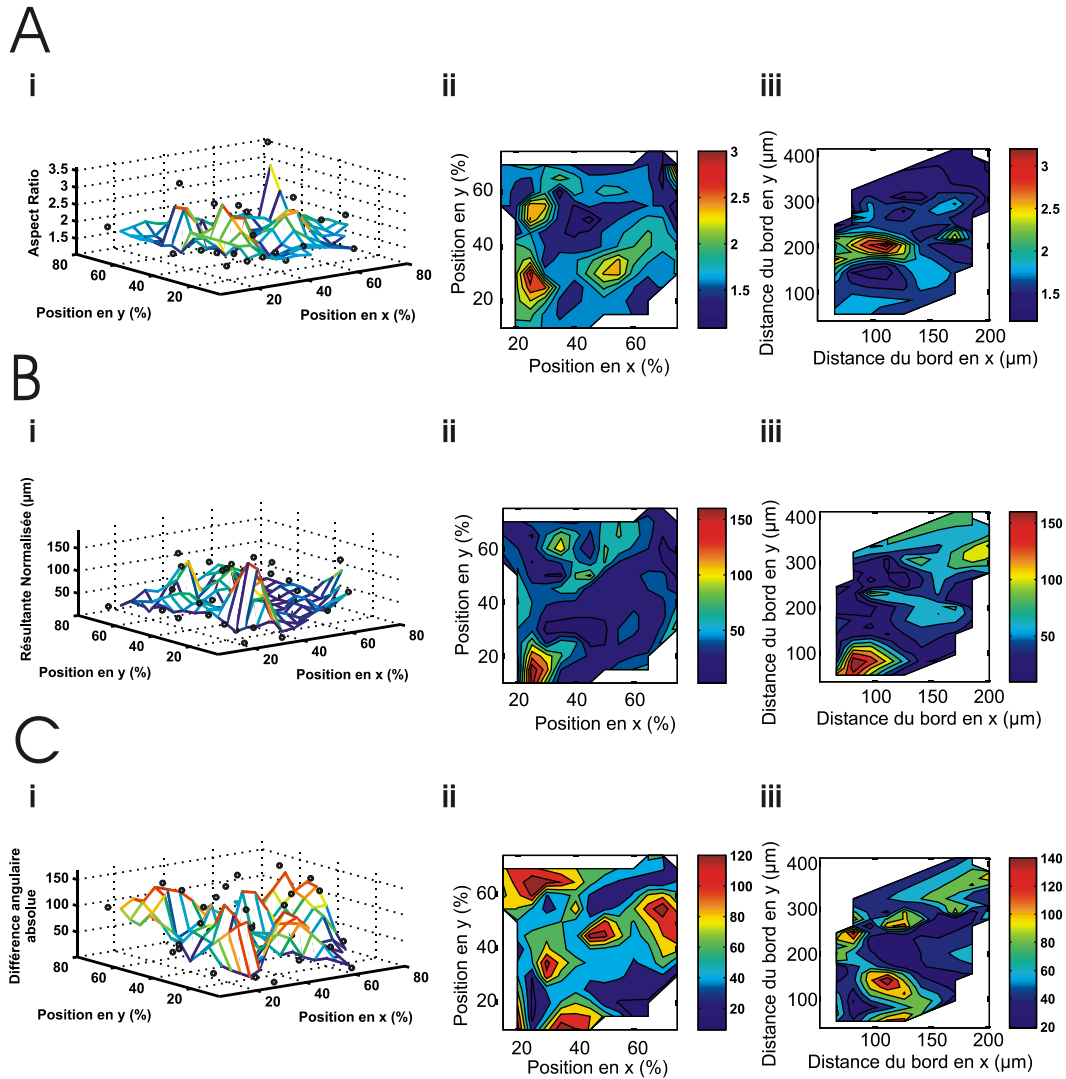


Figure 27. Interpolation des paramètres témoignant de l'orientation des réseaux en fonction de la position dans le NVsnpr-D ($n = 45$). **A**, Effet de la position sur l'excentricité de la surface (Aspect Ratio) des réseaux. **B**, Effet de la position sur la taille du vecteur moyen (μm) de chacun des réseaux. **C**, Effet de la position sur la différence angulaire absolue ($^\circ$). La colonne de gauche (i) représente l'interpolation en trois dimensions des paramètres associés à l'orientation des réseaux, en fonction de la position relative dans le noyau. Les colonnes du centre (ii) et de droite (iii) correspondent aux représentations topographiques des surfaces obtenues par l'interpolation de la position relative dans le NVsnpr-D (ii) et des données exprimées en fonction de la distance (μm) de la bordure du noyau (iii).

DISCUSSION

1. *Considérations fonctionnelles*

Chaque approche utilisée pour l'étude du système nerveux central a ses avantages et ses limitations spécifiques. L'étude du système nerveux *in vitro* en tranches, tel que nous avons procédé, comporte certaines difficultés en ce qui a trait à la représentativité physiologique des conditions étudiées et à la possibilité d'éliminer l'intégration de l'activité cumulée des nombreuses structures impliquées; élément particulièrement important dans le contexte de la genèse d'un patron moteur comme la mastication. Il est donc nécessaire d'interpréter les récents travaux de notre laboratoire à la lumière de nombreux travaux réalisés *in vivo*. Notre approche nous permet cependant d'adresser des questions qui pour l'instant demeurent hors de portée des approches *in vivo*. Ainsi, nous avons la capacité de contrôler le contenu du milieu extracellulaire et nous pouvons nous assurer de travailler, au bon niveau, dans la bonne structure et surtout de cibler le bon type de cellule. Mais surtout, l'approche en tranches nous donne accès à des techniques bien plus précises d'enregistrement, comme le patch-clamp et, de ce fait, ouvre la voie à l'étude des propriétés membranaires intrinsèques des cellules d'intérêt ou de leurs propriétés de réseau et permet la caractérisation de l'effet de variations de l'environnement extracellulaire sur ces mêmes propriétés.

Le mouvement masticatoire est gouverné par un GPC situé au niveau du pons (Dellow et Lund, 1971), dans le tronc cérébral et des neurones situés au sein de la région dorsale du NVsnpr sont d'excellents candidats pour en former le cœur rythmique (Tsuboi et coll., 2003 ; Athanassiadis et coll., 2005 ; Bernier et coll., 2010). En effet, l'activation d'une

conductance I_{NaP} soutient chez ces neurones, lorsque la $[Ca^{2+}]_e$ chute, l'émergence de bouffées de décharges au rythme de la mastication (Brocard et coll., 2006). De telles diminutions locales de la $[Ca^{2+}]_e$ ont été observées dans d'autres régions suite à une activité neuronale intense (Heinemann et coll., 1977; Nicholson et coll., 1978; Benninger et coll., 1980; Nicholson, 1980; Somjen, 1980; Murase et Randic, 1983; Sykova 1997; Russakov et Fine, 2003) ou à l'application d'acides aminés excitateurs (Pumain et Heinemann, 1985; Lücke et coll., 1995), mais les mécanismes en jeux n'ont pas été élucidés. Nous proposons que les astrocytes puissent être en partie responsables de cette chute de la $[Ca^{2+}]_e$ et que le syncytium astrocytaire puisse permettre la synchronisation de l'activité neuronale, au sein du NVsnpr-D. Une augmentation de la taille du syncytium glial survenant en raison d'une diminution locale de la $[Ca^{2+}]_e$ pourrait de plus se traduire par le recrutement et la synchronisation de neurones supplémentaires.

En effet, le syncytium astrocytaire permet la propagation intercellulaire de l'activité calcique et la diffusion de petites molécules d'une cellule à l'autre. Cependant, le concept de synapse tripartite est principalement envisagé et étudié dans le cadre d'un seul astrocyte sensible à l'activité synaptique, puis modulant l'activité d'une synapse ou d'un groupe de synapses présentes au sein de son domaine. L'impact des astrocytes sur la physiologie synaptique mérite cependant d'être également considéré dans une optique populationnelle, mais une telle interaction entre un syncytium glial et un réseau de neurones nécessite une organisation anatomofonctionnelle restreignant l'étendue du réseau glial à une population de neurones. La caractérisation du syncytium astrocytaire

dans le NVsnpr-D constitue donc un premier pas essentiel dans cette direction et forme l'objectif principal de cette étude.

2. Quel est l'effet de l'absence du calcium extracellulaire sur les astrocytes du NVsnpr-D

Le calcium est un élément phare de la physiologie cellulaire et l'acteur principal dans l'excitabilité astrocytaire. Au cours des vingt dernières années, de nombreuses études ont donc décrit l'effet, sur les astrocytes, de son élimination du milieu (Brismar et Collins, 1993; Jeftinija et coll., 1996; Zanotti et Charles, 1997; Stout et coll., 2002; Stout et Charles, 2003; Stridh et coll., 2008). Cependant, ces études ont majoritairement été réalisées en culture et lorsque la préparation en tranches a été employée, elles proviennent principalement d'animaux nouveaux nés. Notre étude est donc une des premières à décrire son effet chez des cellules matures, dans un contexte physiologiquement beaucoup plus représentatif et ayant son pendant fonctionnel en physiologie neuronale (Brocard et coll., 2006).

2.1. Connectivité

Les Figures 4, 7 et 13 rassemblent les comparaisons des paramètres électrophysiologiques et ceux quantifiant l'étendue et la forme du syncytium astrocytaire, en fonction de la concentration calcique extracellulaire. On y note que la

principale différence notable causée par la diminution de la concentration extracellulaire est l'augmentation de la surface du syncytium astrocytaire (Figure 19).

En fait, elle a presque triplé, les surfaces médianes des groupes passant de $12\,501\ \mu\text{m}^2$ à $35\,105\ \mu\text{m}^2$ ($0,012\ \text{mm}^2$ et $0,035\ \text{mm}^2$) (Tableau V). Sans former une exception, les réseaux que nous avons observés restent cependant très petits lorsque comparés à ceux formés de centaines de cellules, couramment rapportés dans la littérature (Porter et McCarthy, 1996; Wallraff et coll., 2004-2006) et il est de même étonnant de constater que malgré l'augmentation de la surface des réseaux, causée par l'absence de calcium extracellulaire, aucun réseau ne couvre plus de 65% de la surface du NVsnpr-D; la médiane étant de 21,1% (Tableau V).

Plusieurs mécanismes sont à même de soutenir un effet direct du calcium (tant extracellulaire qu'intracellulaire) sur les astrocytes et d'expliquer la modulation du couplage observé dans les travaux ci-présents. L'ouverture des connexons par la diminution de la concentration calcique extracellulaire peut effectivement promouvoir la diffusion de la biocytine dans le réseau astrocytaire tant selon une diffusion directe de cellule à cellule par l'entremise de jonction gap que par un mécanisme paracrine, par le biais des hémicanaux. L'ouverture des hémicanaux formés de connexines par la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ a en effet été montrée à plusieurs reprises (Ebihara et Steiner, 1993; Cotrina et coll., 1998; Pfahnl et Dahl, 1999; Srinivas et coll., 2005; Verselis et Srinivas, 2008). Cette action est obtenue en hyperpolarisant la plage d'activation voltages-dépendante des connexons, levant ainsi le mécanisme d'inhibition communément appelé « loop-gating », qui normalement maintient ces canaux fermés, dans des conditions physiologiques. Quist et coll. (2000) ont de plus montré grâce à la

microscopie à force atomique (*Atomic force microscopy* - AFM) de concert à l'imagerie confocale, que l'effet d'une fluctuation de la $[Ca^{2+}]_e$ est dose dépendante et qu'une diminution aussi faible que 0,2 mM (substitution de 1,8 mM à 1,6 mM en solution isotonique) induit une augmentation du volume cellulaire et l'incorporation de *Lucifer yellow* par l'ouverture des connexons formés de Cx43, au potentiel de repos.

La récente révélation de la structure cristallographique d'une première connexine (Cx26) assemblée en jonctions gap a non seulement confirmé la structure théorique soutenue jusqu'alors, mais aussi montré la présence de six hélices centrales formant le point le plus étroit du canal et limitant la taille des molécules pouvant le traverser. La structure révélée montre aussi, au niveau du vestibule du canal, la présence d'une cavité extracellulaire associée à un complexe de forte densité, liant les six hélices centrales et pouvant jouer un rôle dans la régulation de l'état du canal. Cependant, le canal dévoilé étant en configuration ouverte, le site précis à l'origine du « loop gating » n'est toujours pas élucidé. Il semble par contre de plus en plus évident que le calcium extracellulaire n'agit pas à titre de « particule porte », mais davantage comme modulateur d'un mécanisme voltage-dépendant intrinsèque, en modifiant la conformation tridimensionnelle du groupe formant le premier passage transmembranaire au sein de la première boucle extracellulaire (Verselis et coll., 2009). Enfin, la structure révélée confirme également un potentiel de modulation indépendant des connexons formant la jonction (Oshima et coll., 2007; Maeda et coll., 2009).

Parallèlement, bien que les pannexines ne soient pas associées à la formation de jonctions gap et qu'elles soient directement insensibles à une diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ (Pelegrin et Surprenant., 2006; Locovei et coll., 2007), il est fort probable qu'elles soient à l'origine d'une part non négligeable de l'effet de la chute de la $[Ca^{2+}]_e$ sur la taille du syncytium astrocytaire (Suadicani et coll., 2006; Iglesias et coll., 2009). L'ouverture des pannexines est cependant généralement considérée être délétère pour la viabilité cellulaire, en raison de leur très grandes conductance et perméabilité, permettant l'entrée massive de calcium et la sortie de métabolites importants. Bao et coll. (2004) ont néanmoins montré la présence chez les canaux Panx-1 de quatre états intermédiaires entre l'ouverture (~ 500 pS) et la fermeture associée au mécanisme analogue du "loop-gating" retrouvé chez les connexons. Ils ont aussi montré qu'une simple stimulation mécanique ou déformation de la membrane, à même de générer la variation du volume astrocytaire, est aussi apte à induire l'ouverture des canaux Panx-1, au potentiel membranaire de repos. Il a de plus été montré que ce canal forme avec le récepteur purinergique P2X₇ un complexe apte à répondre à la présence d'ATP extracellulaire, par la libération d'ATP et la libération/incorporation concomitante de marqueurs d'un poids pouvant aller jusqu'à ~ 900 kDa présents dans le milieu extracellulaire (Pelegrin et Surprenant, 2006 ; Suadicani et coll., 2006 ; Locovei et coll., 2007; Iglesias et coll., 2008). Il est d'ailleurs important de noter que le récepteur P2X₇ est le seul membre de la famille P2X dont l'affinité et la réponse pour l'ATP augmentent parallèlement à la diminution de la concentration extracellulaire des cations divalents (Virginio et coll., 1997, Duan et coll., 2003). Dans ces mêmes conditions, Cotrina et coll. (1998) ont évalué la quantité d'ATP libérée par les astrocytes comme étant 10 à 1000 fois supérieure à la normale générant ainsi une augmentation du rayon d'interactions

interastrocytaire de près de 150%. Ainsi donc, il est probable que le canal Panx1 ait une activité, chez les astrocytes où il est accompagné par le récepteur canal P2X₇, ressemblant davantage à celle attribuée aux hémicanaux formés de connexines; contrairement à ce qui est observé chez les cellules modèles où il est exprimé de façon isolée.

De façon plus indirecte, il est envisageable qu'une part de l'effet observé par l'élimination du calcium extracellulaire soit soutenue en partie par l'abolition d'un mécanisme inhibiteur dépendant de la $[Ca^{2+}]_i$. En effet, l'exposition prolongée à un milieu extracellulaire sans calcium induit un épuisement des stocks internes et une diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ (Parpura et coll., 1994; Zanotti et Charles, 1997; Grimaldi, 2006). Il semble que, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ diminue rapidement la connectivité des jonctions gap (Scemes et coll., 2007; Harris, 2007, pour des revues). Pour la Cx43, ce mécanisme inhibiteur résultant du calcium cytoplasmique est indirect et nécessite l'action de la calmoduline (Lurtz et Louis, 2007) qui interagît avec la boucle cytoplasmique de la Cx43, entre les résidus 136 à 158 (Zhou et coll., 2007; Myllykoski et coll., 2009). La calmoduline n'est cependant pas la seule protéine intermédiaire en jeu (De Vuyst et coll., 2009) et bien que les travaux de Lurtz et Louis (2007) aient montré qu'elle n'interagit pas directement avec la chaîne C-terminale de la Cx43, il s'avère que l'interaction entre la boucle cytoplasmique et la chaîne C-terminale est d'une importance non négligeable dans la modulation de l'état du connexon (Ponsaerts et coll., 2010). Zanotti et Charles (1997) suggèrent également que l'élimination du calcium extracellulaire lèverait une inhibition posée sur la phospholipase C (PLC) par le calcium,

pour la formation d'IP3 et la libération d'ATP. L'implication de la PLC pourrait être vérifiée par l'utilisation de son antagoniste U73122.

Enfin, il a aussi été montré qu'une exposition à un milieu pauvre en calcium extracellulaire peut engendrer la libération de glutamate par les astrocytes, en culture (Jeftinija et coll., 1996) et que dans l'hippocampe, le NMDA induit une augmentation significative de la taille du syncytium, par l'entremise d'une modification de l'activité neuronale (Serrano et coll., 2008). Connaissant l'impact important d'une diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ sur le patron de décharge des neurones du NVsnpr-D et prenant en considération l'ensemble des résultats précédents, il n'est absolument pas étonnant d'observer une augmentation de la taille du syncytium astrocytaire suite à l'exposition à un ACSF sans calcium.

2.2. Densité cellulaire des syncytia

Les travaux de Houadès et coll. (2006) montrent que les réseaux astrocytaires révélés par la diffusion d'un marqueur n'englobent pas tous les astrocytes marqués à la GFAP inclus dans la zone définie par les limites du réseau. Ainsi, la diffusion du marqueur par un mécanisme extracellulaire ou non spécifique suivant l'exposition à un milieu extracellulaire sans calcium pourrait causer une augmentation de la densité de cellules marquées.

Nous n'avons pas observé de différences significatives allant en ce sens. Au contraire, les réseaux exposés à un ACSF sans calcium tendent à avoir une densité inférieure ($p = 0,067$, si nous retirons les trois valeurs éloignées). Il est tout à fait possible que le caractère non significatif de la probabilité soit causé par la taille de l'échantillon et la puissance du test non paramétrique. Mais avant de spéculer sur de possibles explications physiologiques à ce résultat, il est important de noter que la méthode utilisée, dans le cadre de cette étude, pour délimiter l'entendue des réseaux astrocytaires, restreint celle-ci, en raison de contraintes techniques, à la superficie ceinturant les corps cellulaires marqués. En conséquence de quoi, la partie importante de la surface couverte par les prolongements astrocytaires en marge du syncytium est ignorée. Cette omission introduit un biais tendant à sous-estimer l'aire des réseaux et donc à surestimer leur densité; particulièrement pour ceux présentant un fort rapport périmètre/surface et donc, ayant une proportion élevée de cellules situées en périphérie (c'est-à-dire des réseaux de petite taille, de forte excentricité ou formant une surface concave). L'analyse du Rho de Spearman révèle enfin que la superficie des réseaux, tout comme la proportion du NVsnpr-D qu'ils recouvrent, est négativement corrélée à la densité du réseau (coefficient de corrélation respectif de $-0,53$ et $-0,46$) et que ces relations sont significatives (signification asymptotique bilatérale inférieure à $0,01$). De sorte qu'en définitive, ayant montré que les réseaux, émanant d'une cellule enregistrée en absence de calcium extracellulaire, sont de plus grande taille et regroupent un nombre plus important de cellules; il est tout à fait envisageable que ce biais puisse être à l'origine de la tendance observée des réseaux exposés à un ACSF avec calcium, à présenter une densité cellulaire supérieure.

2.3. Propriétés électrophysiologiques

Contrairement à la proposition de Blomstrand et coll. (2004) voulant qu'une fermeture des jonctions gap devrait s'accompagner d'une augmentation de la résistance d'entrée des astrocytes, nous n'avons, à l'inverse, pas observé de diminution de la résistance d'entrée, associée à la diminution de la concentration calcique extracellulaire (Figure 16); une condition devant induire une ouverture des connexons (Stout et Charles, 2002; Liu et coll., 2006; Verselis et coll., 2008) et qui selon nos résultats induit une augmentation du nombre de cellules couplées. Il est d'autant plus surprenant de ne pas observer de diminution de la résistance d'entrée, que la valeur médiane observée en présence de calcium extracellulaire ($50 \text{ M}\Omega$) est considérablement plus élevée que ce qui est généralement rapporté dans la littérature pour les astrocytes linéaires; tout en étant de loin inférieure à celle des cellules « complexes » (typiquement supérieure à $300 \text{ M}\Omega$) (Bergles et coll., 2000; Lin et coll., 2004; Houadès et coll., 2008). Il est cependant important de noter que bien qu'il soit surprenant d'observer une résistance d'entrée si élevée chez les astrocytes, l'observation n'est pas inédite; Mishima et Hirase (2010) ayant observé une résistance de $57,0 \pm 74,8 \text{ M}\Omega$ *in vivo*, chez les astrocytes situés au niveau du cortex de rats adultes et de $49,0 \pm 64,7 \text{ M}\Omega$ s'ils limitent leur analyse aux cellules exprimant la GFAP.

Par ailleurs, nous n'avons au contraire observé aucun effet de la concentration calcique extracellulaire, sur le potentiel membranaire de repos (Figure 16). Ceci est en contradiction avec Brismar et Collins (1993) et Anderson et coll. (1995), qui ont respectivement observé en culture, que les astrocytes humains et de rats nouveaux nés

subissent une importante dépolarisation par l'exposition à un milieu sans calcium. Il est envisageable qu'un effet dépolarisant de l'absence de calcium extracellulaire ait pu être masqué par le fait qu'à $-63,8 \pm 1,0$ mV, les astrocytes enregistrés en présence de calcium extracellulaire (1,6 mM) soient déjà relativement dépolarisés pour ce qui est rapporté dans la littérature chez les astrocytes linéaires. Cependant, l'élimination du calcium n'ayant pas été compensée dans les solutions des études citées précédemment, la concentration en ions divalents n'a donc pas été maintenue constante. Il est donc davantage plausible que l'effet dépolarisant associé originellement à l'absence de calcium extracellulaire, soit en fait causé par une altération de la répartition des charges à la surface de la membrane cellulaire menant à l'altération de l'excitabilité des canaux ioniques (Jefferys, 1995, une revue).

2.4. Forme et orientation du réseau

Nous avons observé un effet de la concentration calcique extracellulaire sur la taille du syncytium astrocytaire, mais pas sur sa forme ou sur l'importance de l'orientation préférentielle des réseaux (Figure 25). Cela est très intéressant puisque cela suppose que l'augmentation de la taille du syncytium et donc l'ouverture probable de connexons n'ait pas d'impact significatif sur l'orientation préférentielle du réseau. Nous pouvons supposer qu'une connectivité inférieure entre les astrocytes retrouvés en marge du NVsnpr-D pourrait être à l'origine de l'orientation préférentielle observée vers le centre du NVsnpr-D et donc qu'elle ne résulterait pas d'un état fermé des jonctions gap, mais bien de leur l'absence.

Il est cependant important de noter que la faible taille des réseaux et la distance de la bordure du NVsnpr (Figure 19C) puissent atténuer l'effet des facteurs responsables de l'asymétrie de la diffusion et donc l'importance de l'orientation préférentielle. De même, nous observons qu'une majorité de la variabilité dans la différence angulaire absolue provient de réseaux dont la résultante normalisée est de faible envergure (Figure 25 D) et donc de moindre importance. Il est donc possible que notre choix de ne pas retenir de critère de sélection sur la taille minimale des réseaux ou de la résultante normalisée puisse avoir masqué un effet de la $[Ca^{2+}]_e$ sur l'orientation des réseaux.

Le calcium est ubiquitaire dans le système nerveux central et son élimination du milieu extracellulaire altère inévitablement de nombreux aspects de la physiologie cellulaire, tant neuronale que gliale. Les voies cellulaires où il prend part sont cependant si nombreuses, qu'il est difficile d'établir un clair lien de causalité entre l'une d'elles et un phénomène observé.

3. La biocytine diffuse-t-elle par le milieu extracellulaire?

Nous n'avons pas observé d'effet significatif du sens relatif de la perfusion sur l'orientation des réseaux (Figure 26), mais plusieurs arguments soulignent l'importance de s'interroger sur la capacité de la perfusion à déformer le patron de diffusion de la biocytine, particulièrement dans une étude en caractérisant l'orientation dans le réseau astrocytaire.

Premièrement, les hémicanaux ont une conductance supérieure (environ le double) à celle associée en jonctions GAP (Bao et coll., 2004) et permettent tant la libération que l'incorporation de marqueurs de faibles poids moléculaires (Quist et coll., 2000 ; Kang et coll., 2008). Deuxièmement, une grande partie de la propagation de l'activité calcique interastrocytaire observée en culture est soutenue par l'ouverture de ces hémicanaux formés de connexines ou de pannexines et impliquerait principalement la libération d'ATP (Zanotti et Charles, 1997 ; Cotrina et coll., 1998 ; Stout et Charles 2002-2003 ; Kang et coll., 2008 ; Iglesias et coll., 2009). Troisièmement, le sens de la perfusion influence la propagation de cette activité calcique interastrocytaire (Zanotti et Charles, 1997 ; Stout et Charles 2002-2003 ; Bowser et coll., 2007).

De plus, sachant que l'affinité et la réponse pour l'ATP du complexe P2X₇-Panx1 augmentent avec la diminution de la $[Ca^{2+}]_e$, tout comme la probabilité d'ouverture des hémicanaux, il serait envisageable que l'influence de la perfusion soit encore plus importante suite à une exposition à un milieu sans calcium. Dans ce cas, nous nous attendrions à observer, suite à une l'exposition de la tranche à un ACSF faible en calcium, une disparition de l'orientation préférentielle du réseau vers le centre du noyau et voir émerger une dispersion radiale ou une orientation suivant le sens de la perfusion. Au contraire, les réseaux enregistrés en absence de calcium extracellulaire ne présentent pas un aspect ratio davantage près de 1 (ce qui témoignerait d'une diffusion radiale) ou une résultante normalisée différentes que celle des contrôles (ce qui indiquerait une modification de l'asymétrie du réseau par rapport à la cellule enregistrée) (Figure 25).

Zanotti et Charles (1997) et Bowser et coll. (2007) ont quant à eux étudié le réseau astrocytaire du point de vue de la transmission interastrocytaire de l'activité calcique, en culture. Dans ce contexte, ils ont alors tous deux observé un effet de la perfusion sur le sens et la forme de la propagation de l'activité calcique. Plusieurs causes possibles pourraient expliquer cette divergence dans l'effet de la perfusion. Il est tout d'abord possible que des différences dans les mécanismes intrinsèques aux phénomènes mesurés (propagation de vagues calciques comparativement à la diffusion d'un marqueur) ou dans la nature des préparations en culture et en tranches puissent en être la cause et empêcher toutes comparaisons entre nos études. Il est cependant également possible que la perfusion n'ait pas été assez forte dans notre étude pour générer un effet sur la forme et l'orientation des réseaux. En effet, nous ne pouvons pas garantir avoir généré un flux laminaire constant durant toute la durée de l'enregistrement et il est envisageable que la vitesse de la perfusion utilisée dans les travaux ci-présents (1,6 ml/min) n'ait pas été suffisamment élevée; 3 à 4 ml/min ayant été utilisé par Bowser et coll. (2007) et 10 ml/min par Zanotti et Charles (1997). Notre résultat pourrait donc se révéler être un faux négatif.

4. Organisation anatomofonctionnelle des astrocytes

Comme vu précédemment en introduction, le couplage intercellulaire astrocytaire présente une grande variabilité en fonction des régions du SNC et la perception générale du réseau astrocytaire a grandement évolué, au cours des 20 dernières années. Soutenant d'abord qu'il recrute l'ensemble des astrocytes (Binmöller et Müller, 1992; Konietzko et

Müller, 1994), d'où l'expression de syncytium pan-astrocytaire, on sait depuis que sur un même plan focal, tous les astrocytes ne sont pas rassemblés au sein d'un seul et même réseau uniforme (Emsley et Macklis, 2006; Houades et coll., 2006). De plus, malgré quelques pavés jetés dans la marre au cours des dernières années (Agulhon et coll., 2008-2010; Fiacco et coll., 2009, une revue), la contribution des astrocytes à la physiologie synaptique et le concept de synapse tripartite ont grandement gagné en reconnaissance au cours des quinze dernières années. Parallèlement, notre laboratoire a montré à de nombreuses reprises que les neurones au sein du NVsnpr-D sont organisés anatomiquement selon un schéma fonctionnel, les neurones déchargeant par bouffées en phase avec la mastication étant uniquement regroupés dans la région dorso-médiane du noyau (Tsuboi et coll., 2003; Athanassiadis et coll., 2005a et b; Brocard et coll., 2006; Bernier et coll., 2010). Qui plus est, alors que les travaux dans le cortex et l'hippocampe suggéraient que le couplage interastrocytaire est symétrique et présente une diffusion radiale, les travaux de Houades et coll. (2008), montre plutôt que dans le cortex somatosensoriel en barillets, une structure fonctionnellement associée au NVsnpr-V, le syncytium astrocytaire est contraint latéralement à l'intérieur des barillets et s'en trouve allongé dans l'axe orthogonal à la surface du cortex. Ils montrent que cet état de fait résulte d'une diffusion intercellulaire asymétrique générant en une orientation préférentielle, vers le centre du barillet.

Au plan populationnel cependant, nos résultats supportent l'idée d'une compartimentalisation du syncytium glial révélant un couplage entre l'organisation astrocytaire et neuronale. Notamment, nous montrons que la diffusion de la biocytine n'est pas radiale dans les réseaux astrocytaires, au sein du NVsnpr-D. La valeur

d'élongation de la forme des réseaux que nous avons observés est à la fois supérieure à 1 et à celle que l'on peut calculer à partir des données de Houadès et coll. (2008) pour les syncytia présents dans le barillet (Figure 25 et 14). La taille des réseaux astrocytaires augmente avec la distance séparant la cellule enregistrée et la bordure du NVsnpr-D (Figure 21 iii). Nous montrons aussi que les syncytia analysés étant caractérisés par une résultante non nulle, présentant bel et bien une orientation préférentielle (Figure 25) qui ne suit pas une distribution uniforme (Figure 23) et qu'elle est bien orientée vers le centre du NVsnpr-D (Figure 24). De même, nous avons aussi observé que les astrocytes de la région dorso-médiane du NVsnpr-D, où se trouve la population neuronale déchargeant en bouffées, ont un potentiel membranaire de repos plus dépolarisé (Figure 18) et présentent des réseaux de taille supérieure (Figure 21). Le potentiel de repos plus dépolarisé des astrocytes du NVsnpr-D pourrait s'expliquer par une activation continue de leurs récepteurs glutamatergiques métabotropes puisque des données préliminaires obtenues au laboratoire démontrent qu'ils ont bel et bien au moins les récepteurs mGluR3 et que l'application locale d'un antagoniste non-spécifique des récepteurs glutamatergiques métabotropes, le MCPG, produit une hyperpolarisation de 10 mV dans tous les cas enregistrés.

Bien peu de travaux ont caractérisé la forme et l'orientation des syncytia astrocytaires de façon quantitative. Ceux se rapprochant le plus de nos travaux ont été réalisés par Houadès et coll. (2008) dans la colonne d'un barillet du cortex somatosensoriel et dans le cortex visuel de rats adultes. Ils y ont d'abord caractérisé la diffusion de la biocytine selon le rapport entre l'étendue maximale parcourue par la biocytine dans les axes parallèle et orthogonal à la surface du cortex (une approche analogue à l'aspect ratio). Ils

ont ainsi montré que la forme du réseau observé est significativement plus allongée dans le barillet qu'elle ne l'est au niveau du cortex visuel, où elle présente une apparence radiale. Nous pouvons convertir leurs données pour obtenir des valeurs calculées qui peuvent être comparées à nos observations ($1,28 \pm 0,08$ dans le barillet et $1,03 \pm 0,07$ dans le cortex visuel). Dans nos observations, tant la variation de la $[Ca^{2+}]_e$ ou du sens de la perfusion n'affecte pas la valeur d'aspect ratio (Figure 25A et 14A). Dans les deux cas, cette valeur d'élongation est bien supérieure à celle obtenue par Houadès et coll. (2008) dans le barillet et dans le cortex visuel (Tableaux VII et VIII), montrant bien, que les réseaux astrocytaires au sein du NVsnpr-D ne présentent pas une organisation diffuse et homogène. Ils ont ensuite montré une asymétrie de la diffusion, en faveur d'une orientation vers le centre du barillet, apparaissant chez les cellules enregistrées en marge du barillet; ce qui concorde avec nos observations (Figure 27). Enfin, comme nous (Figure 21), ils ont montré que le nombre de cellules recrutées au sein des réseaux augmentait à mesure que les cellules enregistrées s'éloignent de la bordure du barillet et ils en concluent que ce sont les restrictions à la diffusion situées en périphérie du barillet qui expliquent l'existence d'une orientation préférentielle des syncytia astrocytaires.

Une part importante de l'impact observé de la position de la cellule enregistrée pourrait provenir de la discrimination NVsnpr-D/ NVsnpr-V que nous avons établi horizontalement, parallèlement à l'axe médiolatéral; alors que la division fonctionnelle du noyau est davantage dans un plan oblique, avec des sous-noyaux dorso-médian et ventro-latéral. Ce faisant, la région latérale du NVsnpr-D analysée peut correspondre aux septa séparant les barillets du cortex somatosensoriel et expliquer le potentiel

davantage hyperpolarisé (Figure 18 A ii), une taille inférieure des syncytia (Figure 21 ii), une densité légèrement supérieure (Figure 22) et une résultante normalisée de taille inférieure (Figure 15 B ii).

4.1. Origine de la limitation à la diffusion

À supposer que cette organisation anatomofonctionnelle neurogliale existe bel et bien au sein du NVsnpr-D, la question de son origine, quant à elle, demeure. Est-ce l'activité émergeant de l'organisation anatomique neuronale qui façonne, d'un point de vue métabolique, le tissu et mène à cette organisation gliale ou au contraire, est-ce l'organisation gliale qui sert d'échafaud aux neurones en maturation? En effet, l'expression de protéoglycans inhibiteurs en bordure du domaine astroglial, permet l'établissement de signaux de guidages pour les axones en développement. Ces protéoglycans modulent la croissance des axones en séquestrant le calcium extracellulaire augmentant ainsi les variations de sa concentration (Snow et coll., 1990 ; Gonzalez et coll., 1993 ; Steinder, 1993 ; Hrabetová et coll., 2009).

Récemment, la densité astrocytaire a été associée à des différences fonctionnelles au sein du thalamus (Emlsey et Macklis, 2006) et de l'hippocampe (Wallraff et coll., 2006). Dans le cas de l'hippocampe, les auteurs ont d'ailleurs noté que la densité astrocytaire passe du simple au double et varie de $10\,593 \pm 399$ cellules/mm³ à $21\,388 \pm 576$ cellules/mm³ entre la *stratum radiatum* et la *stratum lacunosum moleculare* (Wallraff et coll., 2006). Les restrictions à la diffusion de la biocytine dans le syncytium astrocytaire

à l'origine de l'orientation préférentielle que nous avons observé pourraient donc découler d'une variation dans la densité d'astrocytes présente dans le tissu en marge du noyau. Des résultats préliminaires du laboratoire laissent cependant entrevoir qu'il n'y aurait pas de variation significative de la densité d'astrocytes entre les régions dorsale et ventrale du NVsnpr; ce qui est cohérent avec les résultats de Houadès et coll. (2008), qui n'ont pas non plus observé de telles différences entre les barillets et les septa. Ils montrent en effet que ni une variation dans la densité des astrocytes ou de leurs propriétés électrophysiologiques n'est à même d'expliquer la diffusion différentielle dans le réseau, mais qu'elle origine plutôt d'un patron spatial d'expression limitant la présence des Cx43 et Cx30 aux barillets. Les facteurs extracellulaires à l'origine de ce patron de compartimentalisation restent inconnus, mais Houadès et coll. (2008) soulèvent la possibilité que le rassemblement des neurones en groupes compacts serait davantage impliqué que leur activité en soi, puisque chez la souris déficiente pour la monoamine oxydase A (MAOA^{-/-}), le patron d'expression de Cx43 et Cx30 disparaît conjointement à la disparition des groupes neuronaux compacts, alors que la ségrégation des champs récepteurs en colonnes est préservée. Il est tout de même intéressant de noter que le patron mature d'expression des connexines au niveau du cortex apparaît au même moment que la mastication et I_{NaP} chez les neurones du NVsnpr-D. L'analyse de cette concordance mérite cependant d'être proprement réalisée au niveau du NVsnpr, puisque l'émergence d'une représentation somatotopique diffère beaucoup d'un point de vue ontogénique au niveau du cortex somatosensoriel et du NVsnpr, notamment du point de vue de l'importance qu'y jouent les afférences sensorielle (voir Erzurumlu et coll., 2010, pour une revue). De plus, la représentation somatotopique de la région orofaciale au sein du NVsnpr suit l'expression précoce des gènes Krox20, Drg11 et Lmx1b et est

présente dès E15, soit avant même le début de la maturation des astrocytes (Xiang et coll., 2010).

Le rôle de l'activité neuronale ne doit cependant pas être mis de côté aussi rapidement et seulement sur la base des observations faites sur la souris MAOA^{-/-}. Wang et coll. (2006) ont montré que la stimulation sensorielle des vibrisses induit une réponse calcique astrocytaire *in vivo*, dans les barillets du cortex somatosensoriel, qui est fortement corrélée au potentiel local de champ. D'autres ont observé *in vivo* des variations du potentiel membranaire astrocytaire significativement plus importantes lorsque le potentiel local de champ révélait une activité neuronale synchrone et une augmentation de la $[K^+]_e$ (Mishima et Hirase, 2010; Amzica, 2002). De plus, cette augmentation de la $[K^+]_e$ peut par elle-même d'engendrer une augmentation de la taille du syncytium (De Pina Benabou, 2001) et un influx du calcium extracellulaire (Srinivas et coll., 2006 ; Verselis et coll., 2009). Une telle réponse permettrait ainsi aux astrocytes d'altérer le type de décharge des neurones du NVsnpr, à l'aide d'un mécanisme indépendant de la gliotransmission.

5. Les causes de variabilité

Nous avons volontairement restreint le champ de cette étude, en ne retenant que les cellules présentant une relation I-V linéaire. Cette caractéristique est propre aux astrocytes protoplasmiques de la sous-population GluT qui sont électrophysiologiquement passifs et largement couplés par l'entremise de jonctions gap.

Cependant, les astrocytes forment une lignée cellulaire davantage diversifiée que ce qui a d'abord été suggéré. En effet, ni les critères de classification basés sur le type de tissu nerveux (astrocytes protoplasmiques/fibreux), ni les facteurs que sont l'expression de transporteurs et récepteurs glutaminergiques (GluT/GluR), le patron électrophysiologique (linéaire/rectifiant) ou l'intensité de l'expression de la GFAP ne parviennent à décrire toute la diversité des phénotypes astrocytaires décrits dans la littérature (voir Ademark et Lovinger, 2008; Kimelberg, 2004; Wang et Bordey, 2008 ; Matyash et Kettenmann, 2009; Zhang et Barres, 2010, pour des revues).

Les astrocytes forment en effet un phénotype cellulaire très versatile; leur volume, morphologie, propriétés membranaires et fonctions s'adaptant grandement aux conditions retrouvées dans l'environnement extracellulaire. De plus, contrairement aux résultats observés par Matthias et coll. (2003), certains auteurs ont souligné le fait qu'ils n'ont pas observé de correspondances parfaites entre l'expression de la eGFP liée à la GFAP, le patron d'expression des transporteurs et récepteurs glutaminergiques et le profil électrophysiologique. Ainsi, les travaux de Grass et coll. (2004) présentent l'idée selon laquelle, au sein des structures du tronc cérébral associées à la genèse du rythme respiratoire (le groupe respiratoire ventral, le complexe pré-Bötzinger et le noyau moteur de l'Hypoglosse), on retrouve non pas deux, mais plutôt trois types d'astrocytes. Aux astrocytes passifs et à rectification sortante, s'ajoute alors un type intermédiaire (ou « astrocytes à rectification variable ») présentant des propriétés électrophysiologiques (comme le potentiel membranaire ou la résistance d'entrée) très semblables à celles des cellules GluT, mais présentant aussi des courants potassiques de type A voltage-dépendants (plus faibles que ceux présents chez les cellules complexes) et des courants

rectificatifs sortants transitoires. De plus, fait intéressant, les valeurs de potentiels membranaires notées par Serrano et coll. (2008), à la fois chez les sous-populations d'astrocytes de type GluT comme GluR, suivaient des distributions bimodales; ce qui laisse supposer que la dénomination GluT/GluR ne formerait pas des groupes homogènes. De même, Jabs et coll. (2005) ont souligné que, dans l'hippocampe, les cellules identifiées comme étant de type GluR, sur la base de leur morphologie, ne formeraient pas un groupe homogène, seuls 30% d'entre elles transcrivant l'ARNm de la GFAP et exprimant le S100Beta ; ce qui reproduit les observations rapportées par Wallraff et coll. (2004). Ces résultats électrophysiologiques et immunohistochimiques ont depuis été corroborés dans la couche CA1 de l'hippocampe (Zhou et coll., 2006 ; Schools et coll., 2006) et dans la couche IV du cortex somatosensoriel en barillets de la souris (Houades et coll., 2008). Enfin, Ademark et Lovinger (2008) ont poussé l'idée encore plus loin, allant jusqu'à distinguer chez le rat, les astrocytes passifs du striatum selon trois sous-types en fonction du sens des légères rectifications observées en réponse à une dépolarisation soutenue. Les proportions relatives de ces sous-types d'astrocytes passifs variant en fonction des conditions extracellulaires, il est cependant probable que l'observation de cette diversité de réponses ne témoigne pas de l'existence d'un niveau supérieur de différenciation cellulaire *per se*, mais plutôt de l'incroyable plasticité fonctionnelle des astrocytes; qui pourrait être à l'œuvre dans la grande variabilité obtenue dans nos résultats.

Comme évoqué précédemment, les deux sous-divisions fonctionnelles du NVsnpr sont davantage dorso-médiane et ventro-latérale plutôt que dorsale et ventrale, tel que nous avons retenu en raison de limitations techniques. Cela peut donc avoir un impact majeur

sur la caractérisation de l'orientation des réseaux puisque l'évaluation de la position du centre réel du NVsnpr-D, par rapport auquel était normalisée l'orientation des résultantes des réseaux, peut avoir été sérieusement compromise. Cependant, les observations réalisées sur la distribution de l'angle de l'orientation préférentielle (Figure 23 A ii) ne tiennent pas compte de l'importance relative des vecteurs dont elle représente l'orientation (Figure 23 B ii). Les réseaux dont la taille du vecteur résultant est infime présentent une orientation qui est probablement aléatoire, puisqu'un seul astrocyte ajouté d'un côté ou de l'autre du réseau peut alors grandement en influencer l'orientation. Lorsque nous les retirons, nous observons que la vaste majorité des réseaux sont orientés avec un angle inférieur à 30° par rapport au centre estimé du NVsnpr-D. Cela suggère donc que l'erreur sur l'estimation de la position du centre n'a pas eu d'impact critique sur la caractérisation de l'orientation des réseaux (Figure 24), autrement nous nous serions attendus à observer des orientations suivant une distribution uniforme.

D'autres considérations méthodologiques pourraient être à l'origine d'une part non négligeable de la variabilité observée dans les travaux ci-présents. En effet, nous n'avons pas ajouté d'anti-inflammatoires à notre préparation d'ACSF, alors que la coupe des tranches induit un stress tissulaire intense et que la libération de cytokines pro-inflammatoires induit la fermeture des jonctions gap (Ratamal et coll., 2007). De plus, nous n'avons contrôlé ni la température de l'ACSF perfusé, ni la température dans la chambre d'enregistrement, au niveau de la tranche ; alors qu'il est démontré qu'une diminution de la température de 34 à 20°C induit une augmentation significative de la fréquence, ainsi que de la durée des épisodes calciques astrocytaires (Schipke et coll., 2008).

6. *Nouvelles considérations sur le modèle proposé de GPC*

Il y a un peu plus d'une dizaine d'années, Sandler et coll. (1998) ont montré chez la gerboise qu'une population de neurones de la région dorsale du NVsnpr ont des propriétés intrinsèques leur permettant de décharger en bouffées; ce qui, comme relevé par de nombreux auteurs (Sandler et coll., 1998 ; Tsuboi et coll., 2003 ; Brocard et coll., 2006 ; Bernier et coll., 2010), ne concorde pas avec le simple rôle de relais sensoriel originellement attribué à cette structure. Depuis, notre laboratoire a grandement contribué à élucider les propriétés et éclaircir le rôle de ces neurones, nous permettant de soutenir que cette population de neurones est la plus propice pour former le cœur rythmique du GPC masticatoire.

En effet, une population de neurones situés dans la région rostro-dorsale du NVsnpr projette aux NVmot, NVII, NXII (Travers et Norgren, 1983; Yoshida et coll., 1998 ; Pinganaud et coll., 1999 ; Kolta et coll., 2000 ; Bourque et Kolta, 2001 ; Athanassiadis et coll., 2005a; Yamamoto et coll., 2007), les trois noyaux moteurs associés à l'exécution du comportement masticatoire et plus généralement à l'ingestion de nourriture. Le NVsnpr reçoit des terminaisons synaptiques provenant d'interneurones de la formation réticulée pontique latérale entourant le NVmot et associée à la modulation du patron masticatoire (Westberg et coll., 1998 ; Athanassiadis et coll., 2005a). L'immunoréactivité pour les produits de l'expression du gène *c-fos*, un « *immediate early gene* » utilisé comme biomarqueur d'activité, augmente principalement, dans la région dorsale du NVsnpr, lors d'épisode de mastication fictive (Athanassiadis et coll.,

2005b). Cette population de neurones située dans la région dorso-médiane du NVsnpr rostral, reçoit des afférences sensorielles provenant des fuseaux neuromusculaires et des récepteurs parodontaux, et lors d'épisodes de mastication fictive, induits par une stimulation électrique corticale, modifie son patron de décharges toniques en un patron de bouffées rythmiques, en phase avec la mastication (Tsuboi et coll., 2003).

Notre laboratoire a de plus caractérisé la conductance sodique persistante responsable de ce patron de décharge, chez ces neurones et montré que l'apparition de ce patron de décharges apparait de concert avec la transition entre les mouvements de succion et de mastication et que loin d'éliminer la génération de bouffées rythmiques, l'exposition des neurones de cette population à un milieu extracellulaire faible en calcium, augmente la durée des bouffées, l'importance de l'ADP et la proportion de cellules déchargeant de cette façon (Brocard et coll., 2006 ; Bernier et coll., 2010). Cette sensibilité d' I_{NaP} pour la $[Ca^{2+}]_e$ n'est pas unique au NVsnpr et a été observée dans de nombreuses autres structures, dont le noyau supra-optique de l'hypothalamus, l'hippocampe et la moelle épinière (Li et Hatton, 1996; Su et coll., 2001 ; Golomb et coll., 2006; Zhong et coll., 2007 ; Tazerart et coll., 2008 ; Fekete et coll., 2009).

De plus, sachant que la stimulation du tractus sensoriel est à même d'induire, chez ces neurones, la génération de bouffées rythmiques, par l'entremise du récepteur glutaminergique NMDA (Bernier et coll., 2010) et qu'à l'intérieur de la plage d'activation d' I_{NaP} (-60 à -51 mV) la fréquence des bouffées augmente avec la dépolarisation, il est raisonnable d'envisager que cet influx périphérique serait à même

d'adapter le patron masticatoire en fonction des propriétés des aliments ingérés et de la modification de leur état au fur et à mesure de leur réduction.

Nous proposons que l'activité répétitive des fibres afférentes au noyau produise une diminution de la concentration calcique extracellulaire qui activerait I_{NaP} et ainsi les propriétés intrinsèques de rythmogénèse du NVsnpr. Nous étudions la possibilité que les astrocytes puissent participer à cette chute de la $[Ca^{2+}]_e$ et ainsi occuper une place significative dans la genèse du mouvement masticatoire. Cette hypothèse mérite d'être réinspectée au vu de la littérature récente, dans laquelle l'idée de la participation des astrocytes à la physiologie synaptique et plus précisément à la rythmogénèse respiratoire semble faire son chemin (Holleran et coll., 2001; Hülsmann et coll., 2003 ; Young et coll., 2005; Gourine et coll., 2010 ; Huxtable et coll., 2010).

En effet, de nombreux travaux ont montré que les astrocytes peuvent répondre à l'activité des afférences sensorielles, tant par une faible dépolarisation et/ou une augmentation transitoire de la $[Ca^{2+}]_i$, provenant à la fois de l'activation de récepteurs glutaminergiques (tant ionotropes que métabotropes) (Pasti et coll., 1997; Parri et coll., 2001; Aguado et coll., 2002; Hirase et coll., 2004; Ademark et Lovinger, 2008) et de l'accumulation de potassium extracellulaire associée à l'activité neuronale (Walz et Hertz, 1983; De Pina Benabou, 2001 ; Amzica, 2002 ; Srinivas et coll., 2006 ; Verselis et coll., 2009). Notons également que l'installation du mouvement masticatoire suivant la stimulation corticale ou sensorielle, comme celle de bouffées rythmiques suivant l'application locale de NMDA, ne s'établit qu'à la suite d'un délai de plusieurs centaines de millisecondes et que ces mouvements se poursuivent sur une longue période suivant

la cessation de la stimulation (Tsuboi et coll., 2003; Bernier et coll., 2010), alors que l'influx corticofugale et périphérique atteignent le NVsnpr dans un délai très court, typiquement moins de 10 ms. Cela suggère un mécanisme local et lent rappelant certaines dynamiques de l'activité astrocytaire. Cependant, les réponses calciques astrocytaires apparaissent souvent plusieurs secondes suivant la stimulation. De même, Wang et coll. (2006) ont observé *in vivo* un délai moyen de $3,1 \pm 0,4$ s entre la stimulation des vibrisses et l'émergence de l'activité calcique somatique astrocytaire au niveau des barillets du cortex somatosensoriel, mais ils soulignent par contre que les réponses surviennent dans les prolongements à proximité des synapses en moyenne 1 seconde auparavant. Amzica et coll., 2002 ont cependant observé que les dépolarisations astrocytaires surviennent près de 100 ms suivant l'activité neuronale; ce qui se rapproche davantage de l'ordre de grandeur du délai observé pour l'émergence des bouffées retrouvées dans le NVsnpr.

La régulation du contenu ionique extracellulaire par les astrocytes a été proposée au cours des années 60 (Orkand et coll., 1966; Kuffer et Nicholls, 1966), suite à la démonstration que l'activité neuronale et l'accumulation conséquente de potassium extracellulaire produisent une dépolarisation des astrocytes. Les mécanismes impliqués dans la régulation des concentrations ioniques extracellulaires sont toujours sujet de discussion, mais le concept même est quant à lui largement accepté (Newman, 1986 ; Ballanyi et coll., 1987 ; Xiong et Stringer, 1999 ; Amzica et coll., 2002 ; Willoughby et coll., 2003 ; Kofuji et Newman, 2004 ; Wallraff et coll., 2006 ; Djukic et coll., 2007).

De même, des résultats de simulation montrent bien que le degré de couverture astrocytaire à la synapse, la diminution de la constante de diffusion du calcium, l'ouverture de canaux calciques astrocytaires engendrent tous une diminution importante de la $[Ca^{2+}]_e$ (Smith, 1992 ; Rusakov, 2001) et que le taux astrocytaire de libération de calcium dans le milieu extracellulaire altère significativement le patron de décharges neuronales (Di Garbo et coll., 2007). Cependant, l'homéostasie du calcium extracellulaire par les astrocytes a été nettement moins étudiée physiologiquement. Certains résultats montrent néanmoins que la stimulation glutaminergique, l'augmentation de la $[K^+]_e$ ou l'activation de canaux calciques sensibles au potentiel génèrent toutes trois un influx du calcium extracellulaire, vers les astrocytes (Duffy et MacVicar, 1994-1996; Latour et coll., 2001-2003; Amzica et coll., 2002; D'Ascenzo et coll., 2004). Cependant, Stringer et coll. (2007) n'ont observé qu'une faible composante gliale (mais tout de même significative) dans la réduction de la $[Ca^{2+}]_e$, lors d'épisodes de stimulations prolongées dans l'hippocampe. De plus, Lian et coll. (2004) ont montré, dans le cortex, par l'application de faibles concentrations de fluorocitrate et de son dérivé le fluoroacétate, des antagonistes du cycle de l'acide tricarboxylique astrocytaire, que les astrocytes participent activement à la récupération du niveau de base de la $[Ca^{2+}]_e$ suivant un épisode d'activation neuronale massive et une élimination du calcium extracellulaire, tel qu'observé dans un cas de « *cortical spreading depression* ». Cette diminution de la $[Ca^{2+}]_e$ est alors suivie en quelques secondes par une libération massive du calcium astrocytaire provenant des réserves internes. Cette libération de calcium dans le milieu extracellulaire n'est cependant pas irréconciliable avec notre théorie, puisque ce mécanisme pourrait permettre la cessation de l'activité rythmogénique des neurones

du NVsnpr-D et expliquer l'observation expérimentale d'une cessation de la mastication fictive malgré la continuation de la stimulation corticale.

7. *Perspectives*

Plusieurs expériences restent à faire dans le but de mieux caractériser le syncytium astrocytaire et les interactions neuro-gliales dans le NVsnpr. L'acquisition récente par le laboratoire d'un microscope confocal permettrait aujourd'hui de reprendre et poursuivre ces travaux de caractérisation du syncytium astrocytaire de façon beaucoup plus rapide et efficace en l'utilisant de façon conjuguée à la diffusion d'un marqueur fluorescent en lieu et place de la biocytine révélée à la DAB. Cette technique aurait de nombreux avantages, notamment une réduction du problème de bruit, l'élimination de signal non spécifique et de l'altération du tissu, lié à la révélation de la DAB. De par la capacité d'additionner l'ensemble des plans focaux couvrant le réseau, il serait de plus possible d'obtenir en une seule image nette, l'ensemble des cellules marquées et leurs prolongements. Cette amélioration de l'acquisition des données brutes permettrait subséquemment l'utilisation d'algorithmes de détection automatisée des cellules marquées et conférerait de ce fait une standardisation informatique à l'évaluation du syncytium glial observé; éliminant *de facto* une source possible de variabilité des résultats. Plus intéressant encore, la microscopie confocale nous donne accès à la diffusion en temps réel du marqueur dans le réseau et permet donc la caractérisation de sa cinétique, dans différentes conditions. La récupération de la fluorescence suite à une surexposition (FRAP) permettrait de plus de quantifier la modification de la connectivité

avant et après une stimulation ou un traitement pharmacologique. Le problème avec cette technique demeure toutefois que les sondes fluorescentes ont toutes une taille supérieure à la biocytine et ne peuvent diffuser aussi facilement au travers des jonctions Gap.

7.1. Sortir les enregistrements du NVsnpr-D

Nous montrons que les réseaux astrocytaires enregistrés à l'intérieur du NVsnpr-D sont préférentiellement orientés vers le centre du NVsnpr-D et que la diffusion de la biocytine ne sort que rarement des limites du noyau. Bien que cela compliquerait énormément l'analyse des données, il serait tout de même important de vérifier si les réseaux gliaux enregistrés en périphérie (NVinter et NVsupra) ainsi que dans la moitié ventrale du NVsnpr, sont davantage orientés de façon aléatoire ou dans la direction opposée au centre du NVsnpr-D.

7.2. Marquage des connexines Cx43 et Cx30

Les Cx43 et Cx30 constituent le substrat moléculaire principal du syncytium astrocytaire. Un patron différentiel de leur expression à l'intérieur ou en bordure du NVsnpr-D, comme dans le cortex somatosensoriel (Houadès et coll., 2008) pourrait être à l'origine de l'orientation préférentielle mise en évidence dans les présents travaux. Il serait donc intéressant d'en caractériser le patron spatial d'expression. Il serait

également intéressant de confirmer que le patron développemental d'expression des connexines est le même qu'au niveau du cortex, puisque l'ajout des Cx30 aux Cx43 semble, de prime abord, correspondre au moment où émerge I_{NaP} , le patron de décharge en bouffées dans les neurones du NVsnpr-D et le patron masticatoire adulte (Nagy et coll., 1999 ; Brocard et coll., 2006 ; Houadès et coll., 2008).

7.3. Quel est l'effet du NMDA sur le syncytium astrocytaire

Tout comme la diminution de la concentration calcique extracellulaire, l'application de NMDA altère le mode de décharge des neurones du NVsnpr-D et induit la genèse de bouffées rythmiques (Bernier et coll., 2010). L'existence de récepteurs NMDA astrocytaires est toujours controversée, ou du moins limitée à une sous-population d'astrocytes. Toutefois, de nombreuses données de notre laboratoire (non publiées) démontrent que les astrocytes répondent à l'application locale de NMDA par une dépolarisation et une élévation calcique intracellulaire. Ces réponses persistent en présence de TTX et sont abolies par l'ajout de MK-801, un antagoniste des récepteurs NMDA, dans la solution interne utilisée pour faire les enregistrements intracellulaires indiquant la présence de récepteurs NMDA dans ces cellules. D'autres données préliminaires suggèrent également que le NMDA favorise le couplage entre les astrocytes et augmente la taille du syncytium astrocytaire. Serrano et coll. (2008) ont montré que ceci était aussi le cas au niveau de l'hippocampe, mais que l'effet du NMDA sur les astrocytes de l'hippocampe, était sensible à la TTX ; laissant supposer que l'effet du NMDA passerait par une modification de l'activité neuronale.

7.4. Agonistes et antagonistes purinergiques

Malgré que nous n'ayons pas observé d'effet du sens de la perfusion sur l'orientation préférentielle des réseaux, il serait intéressant sinon essentiel de vérifier s'il y a un lien entre la taille du syncytium astrocytaire et la communication calcique intercellulaire. En conséquence, nous devrions vérifier si la libération d'ATP, un mécanisme central dans la communication interastrocytaire à longue distance, au sein des proverbiales vagues calciques, prend aussi part au phénomène d'augmentation de la taille du réseau. Une implication de la libération extracellulaire d'ATP par les astrocytes, ajouterait du crédit à l'idée d'un rôle fonctionnel de l'augmentation observée de la taille du syncytium, témoignant d'un phénomène actif de communication intercellulaire, plutôt qu'un simple passage facilité du marqueur induit par l'augmentation de la probabilité d'ouverture des connexons en absence de calcium extracellulaire. De nombreuses approches sont possibles pour attester du rôle des voies purinergiques. Un bon indice d'une telle implication de la libération d'ATP serait donné par l'atténuation de l'augmentation de la surface du réseau suivant l'application d'antagonistes purinergiques tels que l'acide pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonique (PPADS), un antagoniste non-sélectif des récepteurs P2 de l'ATP et le Bleu de coomassie ou le KN-62, des antagonistes spécifiques au récepteur P2X₇.

7.5. *L'optogénétique*

Les possibilités qu'offrent les nombreux outils moléculaires disponibles chez la souris, en font maintenant un modèle très intéressant; d'autant plus que son patron masticatoire se rapproche beaucoup de celui du rat (Kobayashi et coll., 2002). Parmi ces outils moléculaires, l'optogénétique pourrait se révéler particulièrement intéressante afin de développer une expérience permettant de vérifier le bienfondé du modèle proposé par le laboratoire. La diversité du répertoire d'outils moléculaires photosensibles s'accroît constamment et la qualité des dynamiques générées s'améliore rapidement. Les dérivés de la rhodopsine canal2 (ChR2) ou du récepteur glutaminergique ionotropique photosensible (LiGluR) sont des canaux cationiques non spécifiques permettant la dépolarisation de la cellule excitée avec une précision à la milliseconde. À l'opposé, l'halorhodopsine eNpHR3.0 est une pompe anionique ayant une cinétique rapide permettant de générer un courant inhibiteur précis et dont la puissance a été augmentée par l'amélioration de sa translocation vers la membrane (Gradinaru et coll., 2010). Il serait possible de restreindre l'expression de ces canaux aux neurones du NVsnpr en utilisant l'activité du gène *Lmx1b* comme rapporteur, puisqu'il est exprimé, dans la portion du tronc cérébral qui nous intéresse, uniquement par les neurones du NVsnpr. De même, il serait possible d'utiliser le gène *Gfap* ou mieux *Aldh1L* (Cahoy et coll., 2008) de sorte à en limiter l'expression aux astrocytes. Gourine et coll. (2010) ont récemment démontré la puissance de cette approche, dans un contexte similaire au nôtre, en rapportant que, *in vivo*, l'activation spécifique des astrocytes du noyau rétrotrapézoïde, à

l'aide de ChR2 induit l'activation du réseau respiratoire et l'initiation de la ventilation chez les animaux apnéiques.

Conclusion

Dans le cadre de l'étude ci-présente, nous avons caractérisé l'effet de l'élimination du calcium extracellulaire et l'effet du sens de la perfusion sur les propriétés membranaires et de connectivité des astrocytes, au sein du noyau sensoriel principal du nerf trijumeau. Nous n'avons observé aucun effet significatif du sens de la perfusion sur les propriétés astrocytaires ; ce qui supporte l'idée que la diffusion de la biocytine, utilisée pour analyser les syncytia astrocytaires, passe bien par les jonctions gap et non par un mécanisme paracrine. Nous avons également démontré que la diminution de la concentration calcique extracellulaire induit une augmentation de la taille des syncytia dans ce noyau, sans affecter les propriétés électrophysiologiques des astrocytes.

Enfin, dans le cadre de cette étude, nous avons mis au point une analyse quantitative permettant la caractérisation spatiale du réseau astrocytaire, tant en terme de symétrie de la diffusion, que d'importance et d'orientation de la diffusion du marqueur utilisé. Au sein du NVsnpr-D, cette analyse nous a permis de conclure que la diffusion n'est pas radiale et symétrique, mais bel et bien préférentiellement orientée vers le centre du noyau. De plus, nous avons observé que la région du NVsnpr présentant la plus grande proportion de neurones déchargeant en bouffées spontanées est aussi celle présentant les astrocytes les plus dépolarisés et les réseaux astrocytaires de plus grande taille. Nous avons donc observé que, dans le NVsnpr-D, l'organisation du réseau astrocytaire est bien structurée et suit l'organisation neuronale.

Bien que les travaux présentés ici ne permettent pas de vérifier directement l'implication des astrocytes dans la génération du rythme masticatoire, l'observation d'une organisation bien structurée au sein du NVsnpr-D ajoute un jalon important à l'hypothèse de départ et suggère que par les limites de leur syncytia, les astrocytes pourraient former des domaines tridimensionnels à l'intérieur desquels les neurones baigneraient tous dans le même environnement extracellulaire.

Bibliographie

1. Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J.F., Carmona, M.A. & Soriano, E. Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 9430-44 (2002).
2. Agulhon, C., Fiacco, T. a & McCarthy, K.D. Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. *Science (New York, N.Y.)* **327**, 1250-4 (2010).
3. Agulhon, C. et coll. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* **59**, 932-46 (2008).
4. Amzica, F., Massimini, M. & Manfredi, A. Spatial buffering during slow and paroxysmal sleep oscillations in cortical networks of glial cells in vivo. *The Journal of neuroscience* **22**, 1042 (2002).
5. Amzica, F. In vivo electrophysiological evidences for cortical neuron-glia interactions during slow (<1 Hz) and paroxysmal sleep oscillations. *Journal of physiology, Paris* **96**, 209-19 (2002).
6. Anderson, S., Brismar, T. & Hansson, E. Effect of external K⁺, Ca²⁺, and Ba²⁺ on membrane potential and ionic conductance in rat astrocytes. *Cellular and molecular neurobiology* **15**, 439-50 (1995).
7. Andriezen, W.L. The neuroglia elements of the brain. *British medical journal* **2**, 227-230 (1893).
8. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P. & Haydon, P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences* **22**, 208-15 (1999).
9. Ardran, G.M., Kemp, F.H. & Lind, J. A cineradiographic study of bottle feeding. *The British journal of radiology* **31**, 11-22 (1958).
10. Athanassiadis, T., Olsson, K. a, Kolta, a & Westberg, K.-G. Identification of c-Fos immunoreactive brainstem neurons activated during fictive mastication in the rabbit. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* **165**, 478-89 (2005).
11. Athanassiadis, T., Westberg, K.-G., Olsson, K. a & Kolta, a Physiological characterization, localization and synaptic inputs of bursting and nonbursting neurons in the trigeminal principal sensory nucleus of the rat. *The European journal of neuroscience* **22**, 3099-110 (2005).

12. Auld, D.S. & Robitaille, R. Glial Cells and Neurotransmission: An Inclusive View of Synaptic Function. *Neuron* **40**, 389–400 (2003).
13. Bae, Y.C. et coll. Identification of signal substances in synapses made between primary afferents and their associated axon terminals in the rat trigeminal sensory nuclei. *The Journal of comparative neurology* **418**, 299–309 (2000).
14. Bae, Y.C. et coll. Synaptic organization of tooth pulp afferent terminals in the rat trigeminal sensory nuclei. *The Journal of comparative neurology* **463**, 13–24 (2003).
15. Bae, Y.C. et coll. GABA and glycine in synaptic microcircuits associated with physiologically characterized primary afferents of cat trigeminal principal nucleus. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* **162**, 449–57 (2005).
16. Ballanyi, K., Grafe, P. & ten Bruggencate, G. Ion activities and potassium uptake mechanisms of glial cells in guinea-pig olfactory cortex slices. *The Journal of physiology* **382**, 159–74 (1987).
17. Bao, L., Locovei, S. & Dahl, G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS letters* **572**, 65–68 (2004).
18. Bates, C.A. & Killackey, H.P. The organization of the neonatal rat's brainstem trigeminal complex and its role in the formation of central trigeminal patterns. *The Journal of comparative neurology* **240**, 265–87 (1985).
19. Batini, C., Buisseret-Delmas, C. & Corvisier, J. Horseradish peroxidase localization of masticatory muscle motoneurons in cat. *Journal de physiologie* **72**, 301–9 (1976).
20. Beattie, E.C. et coll. Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science (New York, N.Y.)* **295**, 2282–5 (2002).
21. Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature reviews. Neuroscience* **3**, 728–39 (2002).
22. Benninger, C., Kadis, J. & Prince, D.A. Extracellular calcium and potassium changes in hippocampal slices. *Brain research* **187**, 165–82 (1980).
23. Bergles, D.E., Diamond, J.S. & Jahr, C.E. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Current opinion in neurobiology* **9**, 293–8 (1999).
24. Bergles, D.E., Roberts, J.D., Somogyi, P. & Jahr, C.E. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* **405**, 187–91 (2000).

25. Bernier, A. Réponses des neurones du noyau sensoriel principal du trijumeau à la stimulation de leurs afférences primaires. 127 (2007).
26. Bernier, A., Arsenault, I., Lund, J. & Kolta, A. Effect of the stimulation of sensory inputs on the firing of neurons of the trigeminal main sensory nucleus in the rat. *Journal of neurophysiology* **103**, 915-23 (2010).
27. Bianco, F. et coll. Different properties of P2X(7) receptor in hippocampal and cortical astrocytes. *Purinergic signalling* **5**, 233-40 (2009).
28. Binmöller, F.J. & Müller, C.M. Postnatal development of dye-coupling among astrocytes in rat visual cortex. *Glia* **6**, 127-37 (1992).
29. Blomstrand, F. et coll. Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *European Journal of Neuroscience* **19**, 1005–1015 (2004).
30. Bordey, a & Sontheimer, H. Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia* **30**, 27-38 (2000).
31. Bourque, M. & Kolta, A. Properties and interconnections of trigeminal interneurons of the lateral pontine reticular formation in the rat. *Journal of Neurophysiology* **86**, 2583 (2001).
32. Bouskila, Y. & Dudek, F.E. Neuronal synchronization without calcium-dependent synaptic transmission in the hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3207-10 (1993).
33. Bowser, D.N. & Khakh, B.S. Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 4212-7 (2007).
34. Bowser, D.N. & Khakh, B.S. Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *The Journal of general physiology* **129**, 485-91 (2007).
35. Bremer, F. Physiologie nerveuse de la mastication chez le chat et le lapin. Reflexes de mastication. Reponses masticatrices corticales et centre cortical du gout. *Archives Internationales de Physiologie* **21**, 308-358 (1923).
36. Brismar, T. & Collins, V.P. Effect of external cation concentration and metabolic inhibitors on membrane potential of human glial cells. *The Journal of physiology* **460**, 365-83 (1993).

37. Brocard, F., Verdier, D., Arsenault, I., Lund, J.P. & Kolta, A. Emergence of intrinsic bursting in trigeminal sensory neurons parallels the acquisition of mastication in weanling rats. *Journal of neurophysiology* **96**, 2410-24 (2006).
38. Bruzzone, R., Barbe, M.T., Jakob, N.J. & Monyer, H. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of neurochemistry* **92**, 1033-43 (2005).
39. Bukauskas, F.F. & Peracchia, C. Two distinct gating mechanisms in gap junction channels: CO₂-sensitive and voltage-sensitive. *Biophysical journal* **72**, 2137-42 (1997).
40. Bukauskas, F.F., Bukauskiene, A. & Verselis, V.K. Conductance and permeability of the residual state of connexin43 gap junction channels. *The Journal of general physiology* **119**, 171-85 (2002).
41. Bushong, E. a, Martone, M.E., Jones, Y.Z. & Ellisman, M.H. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 183-92 (2002).
42. Butt, A.M., Hamilton, N., Hubbard, P., Pugh, M. & Ibrahim, M. Synantocytes: the fifth element. *Journal of anatomy* **207**, 695-706 (2005).
43. Byrd, K.E. Mandibular movement and muscle activity during mastication in the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Journal of morphology* **170**, 147-69 (1981).
45. Cahoy, J.D. et coll. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 264-78 (2008).
46. Chandler, S.H. & Tal, M. The effects of brain stem transections on the neuronal networks responsible for rhythmical jaw muscle activity in the guinea pig. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **6**, 1831-42 (1986).
47. Charles, A.C., Merrill, J.E., Dirksen, E.R. & Sanderson, M.J. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* **6**, 983-92 (1991).
48. Christopherson, K.S. et coll. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120**, 421-33 (2005).
49. Chvátal, A., Pastor, A., Mauch, M., Syková, E. & Kettenmann, H. Distinct populations of identified glial cells in the developing rat spinal cord slice: ion

- channel properties and cell morphology. *The European journal of neuroscience* **7**, 129-42 (1995).
50. Colley, J.R. & Creamer, B. Sucking and swallowing in infants. *British medical journal* **2**, 422-3 (1958).
 51. Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S. & Smith, S.J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science (New York, N.Y.)* **247**, 470-3 (1990).
 52. Cotrina, M.L. et coll. Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 2520-37 (1998).
 53. Cotrina, M.L. et coll. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15735-40 (1998).
 54. Dahl, D. The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *Journal of neuroscience research* **6**, 741-8 (1981).
 55. Dai, J.-X., Hu, Z.-L., Shi, M., Guo, C. & Ding, Y.-Q. Postnatal ontogeny of the transcription factor Lmx1b in the mouse central nervous system. *The Journal of comparative neurology* **509**, 341-55 (2008).
 56. Danbolt, N.C. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology* **65**, 1-105 (2001).
 57. D'Ascenzo, M. et coll. Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N- (Cav2.2), and R- (Cav2.3) type Ca²⁺ channels in rat cortical astrocytes. *Glia* **45**, 354-63 (2004).
 58. de Feijter, A.W. et coll. Localization and function of the connexin 43 gap-junction protein in normal and various oncogene-expressing rat liver epithelial cells. *Molecular carcinogenesis* **16**, 203-12 (1996).
 59. De Pina-Benabou, M.H., Srinivas, M., Spray, D.C. & Scemes, E. Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 6635-43 (2001).
 60. De Vuyst, E. et coll. Ca(2+) regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell calcium* **46**, 176-87 (2009).

61. Deiters, O. *Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark des Menschen und der Säugethiere*. 318 (Vieweg: 1865).
62. del Río-Hortega, P. La microglia y su transformación en células en basoncito y cuerpos gránulo-adiposos. *Trab. Lab. Invest. Biol. Madrid* **18**, 37-82 (1920).
63. Dellow, P. & Lund, J. Evidence for central timing of rhythmical mastication. *The Journal of Physiology* **215**, 1-13 (1971).
64. D'hondt, C., Ponsaerts, R., De Smedt, H., Bultynck, G. & Himpens, B. Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **31**, 953-74 (2009).
65. Di Garbo, A., Barbi, M., Chillemi, S., Alloisio, S. & Nobile, M. Calcium signalling in astrocytes and modulation of neural activity. *Bio Systems* **89**, 74-83 (2007).
66. Djukic, B., Casper, K.B., Philpot, B.D., Chin, L.-S. & McCarthy, K.D. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 11354-65 (2007).
67. Dombeck, D.A., Khabbaz, A.N., Collman, F., Adelman, T.L. & Tank, D.W. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron* **56**, 43-57 (2007).
68. Donga, R., Lund, J.P. & Veilleux, D. An electrophysiological study of trigeminal commissural interneurons in the anaesthetized rabbit. *Brain research* **515**, 351-4 (1990).
69. Donga, R. & Lund, J.P. Discharge patterns of trigeminal commissural last-order interneurons during fictive mastication in the rabbit. *Neurophysiology* **66**, (1991).
70. Druzinsky, R. The time allometry of mammalian chewing movements: chewing frequency scales with body mass in mammals. *Journal of theoretical biology* **160**, 427-440 (1993).
71. Duan, S. et coll. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 1320-8 (2003).
72. Duffy, S. & MacVicar, B.A. Potassium-dependent calcium influx in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Neuroscience* **61**, 51-61 (1994).

73. Duffy, S. & MacVicar, B.A. In vitro ischemia promotes calcium influx and intracellular calcium release in hippocampal astrocytes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 71-81 (1996).
74. Ebihara, L. & Steiner, E. Properties of a nonjunctional current expressed from a rat connexin46 cDNA in *Xenopus* oocytes. *The Journal of general physiology* **102**, 59-74 (1993).
75. Ebihara, L., Liu, X. & Pal, J.D. Effect of external magnesium and calcium on human connexin46 hemichannels. *Biophysical journal* **84**, 277-86 (2003).
76. Eisenman, J., Landgren, S. & Novin, D. Functional organization in the main sensory trigeminal nucleus and in the rostral subdivision of the nucleus of the spinal trigeminal tract in the cat. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* SUPPL214:1-44 (1963).
77. Emsley, J.G. & Macklis, J.D. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron glia biology* **2**, 175-186 (2006).
78. Enomoto, A., Kogo, M., Koizumi, H., Ishihama, K. & Yamanishi, T. Localization of premotoneurons for an NMDA-induced repetitive rhythmical activity to TMNs. *Neuroreport* **13**, 2303-7 (2002).
79. Enomoto, S., Schwartz, G. & Lund, J.P. The effects of cortical ablation on mastication in the rabbit. *Neuroscience letters* **82**, 162-6 (1987).
80. Erzurumlu, R.S. & Killackey, H.P. Development of order in the rat trigeminal system. *The Journal of comparative neurology* **213**, 365-80 (1983).
81. Erzurumlu, R.S., Murakami, Y. & Rijli, F.M. Mapping the face in the somatosensory brainstem. *Nature reviews. Neuroscience* **11**, 252-63 (2010).
82. Fekete, A. et coll. Mechanism of the persistent sodium current activator veratridine-evoked Ca elevation: implication for epilepsy. *Journal of neurochemistry* **111**, 745-56 (2009).
83. Feldman, J.L. & Ellenberger, H.H. Central coordination of respiratory and cardiovascular control in mammals. *Annual review of physiology* **50**, 593-606 (1988).
84. Feldman, J.L. & Del Negro, C.A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nature Reviews. Neuroscience* **7**, 232 (2006).

85. Fellin, T. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *Journal of neurochemistry* **108**, 533-44 (2009).
86. Fellin, T. et coll. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* **43**, 729-43 (2004).
87. FERRIER, D. *The Function of the Brain*. 498 (Smith, Elder & Co: Londre, 1886).
88. Fiacco, T. a, Agulhon, C. & McCarthy, K.D. Sorting out astrocyte physiology from pharmacology. *Annual review of pharmacology and toxicology* **49**, 151-74 (2009).
89. Goldberg, L.J. & Tal, M. Intracellular recording in trigeminal motoneurons of the anesthetized guinea pig during rhythmic jaw movements. *Experimental neurology* **58**, 102-10 (1978).
90. Golgi, C. *Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso*. 214 (1885).
91. Golomb, D., Yue, C. & Yaari, Y. Contribution of persistent Na⁺ current and M-type K⁺ current to somatic bursting in CA1 pyramidal cells: combined experimental and modeling study. *Journal of neurophysiology* **96**, 1912-26 (2006).
92. González, D., Gómez-Hernández, J.M. & Barrio, L.C. Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal. *Progress in biophysics and molecular biology* **94**, 66-106
93. Gonzalez, M. de L., Malemud, C.J. & Silver, J. Role of astroglial extracellular matrix in the formation of rat olfactory bulb glomeruli. *Experimental neurology* **123**, 91-105 (1993).
94. Gourine, A.V. et coll. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science (New York, N.Y.)* **329**, 571-5 (2010).
95. Gradinaru, V. et coll. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* **141**, 154-65 (2010).
96. Grass, D. et coll. Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 1358-65 (2004).
97. Grillner, S. The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 573-586 (2003).

98. Grimaldi, M. Astrocytes refill intracellular Ca^{2+} stores in the absence of cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ elevation: A functional rather than a structural ability. *Journal of neuroscience research* **84**, 1738–1749 (2006).
99. Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H. & Haydon, P.G. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 6473-7 (2007).
100. Harris, A.L. Gating on the outside. *The Journal of general physiology* **133**, 549-53 (2009).
101. Harris, A.L. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Progress in biophysics and molecular biology* **94**, 120-43 (2007).
102. Harris-Warrick, R.M. General principles of rhythmogenesis in central pattern generator networks. *Progress in brain research* **187**, 213-22 (2010).
103. Hassinger, T.D., Guthrie, P.B., Atkinson, P.B., Bennett, M.V. & Kater, S.B. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13268-73 (1996).
104. Haydon, P.G. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience* **2**, 185–193 (2001).
105. Heinemann, U., Lux, H.D. & Gutnick, M.J. Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* **27**, 237-43 (1977).
106. Herring, S. The Ontogeny of Mammalian Mastication. *Integrative and Comparative Biology* **25**, 339-350 (1985).
107. Higashi, K. et coll. An inwardly rectifying $\text{K}(+)$ channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *American journal of physiology. Cell physiology* **281**, C922-31 (2001).
108. Hiimae, K.M., Hayenga, S.M. & Reese, A. Patterns of tongue and jaw movement in a cinefluorographic study of feeding in the macaque. *Archives of oral biology* **40**, 229-46 (1995).
109. Hiimae, K.H., Thexton, A., McGarrick, J. & Crompton, A.W. The movement of the cat hyoid during feeding. *Archives of Oral Biology* **26**, 65-81 (1981).

110. Hiraba, H. & Sato, T. Cortical control of mastication in the cat: properties of mastication-related neurons in motor and masticatory cortices. *Somatosensory & motor research* **21**, 217-27 (2004).
111. Hirase, H., Qian, L., Barthó, P. & Buzsáki, G. Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS biology* **2**, e96 (2004).
112. Hirase, H., Creso, J., Singleton, M., Barthó, P. & Buzsáki, G. Two-photon imaging of brain pericytes in vivo using dextran-conjugated dyes. *Glia* **46**, 95-100 (2004).
113. Holleran, J., Babbie, M. & Erlichman, J.S. Ventilatory effects of impaired glial function in a brain stem chemoreceptor region in the conscious rat. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **90**, 1539-47 (2001).
114. Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I. & Giaume, C. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 5207-17 (2008).
115. Houades, V. et coll. Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron glia biology* **2**, 3-14 (2006).
116. Hrabetová, S., Masri, D., Tao, L., Xiao, F. & Nicholson, C. Calcium diffusion enhanced after cleavage of negatively charged components of brain extracellular matrix by chondroitinase ABC. *The Journal of physiology* **587**, 4029-49 (2009).
117. Huang, C., Hiraba, H., Murray, G. & Sessle, B. Topographical distribution and functional properties of cortically induced rhythmical jaw movements in the monkey (*Macaca fascicularis*). *Journal of Neurophysiology* **61**, 635 (1989).
118. Hülsmann, S., Straub, H., Richter, D.W. & Speckmann, E.-J. Blockade of astrocyte metabolism causes delayed excitation as revealed by voltage-sensitive dyes in mouse brainstem slices. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* **150**, 117-21 (2003).
119. Humphrey, T. Some Correlations between the Appearance of Human Fetal Reflexes and the Development of the Nervous System. *Growth and Maturation of the Brain* **4**, 93-135 (1964).
120. Huxtable, A.G. et coll. Glia contribute to the purinergic modulation of inspiratory rhythm-generating networks. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 3947-58 (2010).
121. Iadecola, C. & Nedergaard, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature neuroscience* **10**, 1369–1376 (2007).

122. Ide, L.S. & Killackey, H.P. Fine structural survey of the rat's brainstem sensory trigeminal complex. *The Journal of comparative neurology* **235**, 145-68 (1985).
123. Iglesias, R. et coll. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **295**, C752 (2008).
124. Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D.C.D.C. & Scemes, E. Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels". *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 7092 (2009).
125. Inoue, M., Nozawa-Inoue, K., Donga, R. & Yamada, Y. Convergence of selected inputs from sensory afferents to trigeminal premotor neurons with possible projections to masseter motoneurons in the rabbit. *Brain research* **957**, 183-91 (2002).
126. Ishihama, K. et coll. Oral-motor patterns of rhythmic trigeminal activity generated in fetal rat brainstem in vitro. *Brain research. Developmental brain research* **145**, 163 (2003).
127. Ishihama, K. & Turman, J.E. NR3 protein expression in trigeminal neurons during postnatal development. *Brain research* **1095**, 12-6 (2006).
128. Jabs, R. et coll. Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity. *Journal of cell science* **118**, 3791-803 (2005).
129. Jacquin, M.F., Chiaia, N.L., Haring, J.H. & Rhoades, R.W. Intersubnuclear connections within the rat trigeminal brainstem complex. *Somatosensory & motor research* **7**, 399-420 (1990).
130. Jacquin, M.F. et coll. In DRG11 knock-out mice, trigeminal cell death is extensive and does not account for failed brainstem patterning. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 3577-85 (2008).
131. Jacquin, T.D. et coll. Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. *Neuron* **17**, 747-58 (1996).
132. Jefferys, J.G. Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiological reviews* **75**, 689-723 (1995).
133. Jefferys, J.G. & Haas, H.L. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature* **300**, 448-50 (1982).

134. Jeftinija, S.D., Jeftinija, K.V., Stefanovic, G. & Liu, F. Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from cultured astrocytes. *Journal of neurochemistry* **66**, 676-84 (1996).
135. Kafitz, K.W., Meier, S.D., Stephan, J. & Rose, C.R. Developmental profile and properties of sulforhodamine 101--Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *Journal of neuroscience methods* **169**, 84-92 (2008).
136. Kang, J. et coll. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *Journal of Neuroscience* **28**, 4702-4711 (2008).
137. Kimelberg, H.K. The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry international* **45**, 191-202 (2004).
138. Kirchhoff, F. Questionable calcium. *Science (New York, N.Y.)* **327**, 1212-3 (2010).
139. Kobayashi, M. et coll. Electrophysiological analysis of rhythmic jaw movements in the freely moving mouse. *Physiology & behavior* **75**, 377-85 (2002).
140. Kofuji, P. & Newman, E.A. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* **129**, 1045-56 (2004).
141. Kolta, A., Westberg, K. & Lund, J. Identification of brainstem interneurons projecting to the trigeminal motor nucleus and adjacent structures in the rabbit. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **19**, 175-195 (2000).
142. Kolta, A., Morquette, P., Lavoie, R., Arsenault, I. & Verdier, D. Modulation of rhythmic properties of trigeminal neurons contributing to the masticatory CPG. *Progress in brain research* **187**, 137-48 (2010).
143. Konietzko, U. & Müller, C.M. Astrocytic dye coupling in rat hippocampus: topography, developmental onset, and modulation by protein kinase C. *Hippocampus* **4**, 297-306 (1994).
144. Konnerth, A., Heinemann, U. & Yaari, Y. Slow transmission of neural activity in hippocampal area CA1 in absence of active chemical synapses. *Nature* **307**, 69-71 (1984).
145. Kuchibhotla, K.V., Lattarulo, C.R., Hyman, B.T. & Bacskaï, B.J. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science (New York, N.Y.)* **323**, 1211-5 (2009).
146. Kuffler, S.W. & Nicholls, J.G. The physiology of neuroglial cells. *Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie* **57**, 1-90 (1966).

147. Kuffler, S., Nicholls, J. & Orkand, R. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *Journal of neurophysiology* **29**, 768 (1966).
148. Langenbach, G.E., Weijs, W.A., Brugman, P. & van Eijden, T.M. A longitudinal electromyographic study of the postnatal maturation of mastication in the rabbit. *Archives of oral biology* **46**, 811-20 (2001).
149. Latour, I., Gee, C.E., Robitaille, R. & Lacaille, J.C. Differential mechanisms of Ca^{2+} responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. *Hippocampus* **11**, 132-45 (2001).
150. Latour, I., Hamid, J., Beedle, A.M., Zamponi, G.W. & Macvicar, B.A. Expression of voltage-gated Ca^{2+} channel subtypes in cultured astrocytes. *Glia* **41**, 347-53 (2003).
151. Li, Y.Q., Takada, M., Kaneko, T. & Mizuno, N. Premotor neurons for trigeminal motor nucleus neurons innervating the jaw-closing and jaw-opening muscles: differential distribution in the lower brainstem of the rat. *The Journal of comparative neurology* **356**, 563-79 (1995).
152. Li, Z. & Hatton, G.I. Oscillatory bursting of phasically firing rat supraoptic neurones in low- Ca^{2+} medium: Na^{+} influx, cytosolic Ca^{2+} and gap junctions. *The Journal of physiology* **496** (Pt 2, 379-94 (1996).
153. Lian, X.-Y. & Stringer, J.L. Astrocytes contribute to regulation of extracellular calcium and potassium in the rat cerebral cortex during spreading depression. *Brain research* **1012**, 177-84 (2004).
154. Lin, S.-chun & Bergles, D.E. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature neuroscience* **7**, 24-32 (2004).
155. Liu, F., Arce, F.T., Ramachandran, S. & Lal, R. Nanomechanics of hemichannel conformations: connexin flexibility underlying channel opening and closing. *The Journal of biological chemistry* **281**, 23207-17 (2006).
156. Liu, Z.J. et coll. Coordination of cortically induced rhythmic jaw and tongue movements in the rabbit. *Journal of neurophysiology* **69**, 569-84 (1993).
157. Liu, Z.-liang et coll. Responses of neurons and astrocytes in rat hippocampus to kainic acid-induced seizures. *Academic journal of the first medical college of PLA* **23**, 1151-5 (2003).
158. Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D.C. & Dahl, G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the $\text{P2X}(7)$ receptor death complex. *FEBS letters* **581**, 483-8 (2007).

159. Lucke, K.T., Kerr, M.E. & Chovanes, G.I. Continuous bedside cerebral blood flow monitoring. *The Journal of neuroscience nursing: journal of the American Association of Neuroscience Nurses* **27**, 164-73 (1995).
160. Lumsden, A. & Keynes, R. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* **337**, 424-8 (1989).
161. Lund, J.P. & Lamarre, Y. Activity of neurons in the lower precentral cortex during voluntary and rhythmical jaw movements in the monkey. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* **19**, 282-99 (1974).
162. Lund, J.P. & Olsson, K.A. The importance of reflexes and their control during jaw movement. *Trends in Neurosciences* **6**, 458-463 (1983).
163. Lund, J.P. & Kolta, A. Generation of the central masticatory pattern and its modification by sensory feedback. *Dysphagia* **21**, 167-74 (2006).
164. Lund, J. Mastication and its control by the brain stem. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **2**, 33 (1991).
165. Lund, J., Sasamoto, K., Murakami, T. & Olsson, K. Analysis of rhythmical jaw movements produced by electrical stimulation of motor-sensory cortex of rabbits. *Journal of neurophysiology* **52**, 1014 (1984).
166. Lurtz, M.M. & Louis, C.F. Purinergic receptor-mediated regulation of lens connexin43. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**, 4177-86 (2007).
167. Maeda, S. et coll. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* **458**, 597-602 (2009).
168. Magoun, H.W., Ranson, S.W. & Fisher, C. Corticofugal pathways for mastication, lapping and other motor functions in the cat. *Archives of Neurology & Psychiatry* **30**, 292 (1933).
169. Matthias, K. et coll. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience* **23**, 1750 (2003).
170. Matyash, V. & Kettenmann, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain research reviews* **63**, 2-10 (2010).
171. McDavid, S., Verdier, D., Lund, J.P. & Kolta, A. Electrical properties of interneurons found within the trigeminal motor nucleus. *The European journal of neuroscience* **28**, 1136-45 (2008).

172. Mishima, T. & Hirase, H. In vivo intracellular recording suggests that gray matter astrocytes in mature cerebral cortex and hippocampus are electrophysiologically homogeneous. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 3093-100 (2010).
173. Morimoto, T. & Kawamura, Y. Properties of tongue and jaw movements elicited by stimulation of the orbital gyrus in the cat. *Archives of Oral Biology* **18**, 361-372 (1973).
174. Murase, K. & Randić, M. Electrophysiological properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro: calcium-dependent action potentials. *The Journal of physiology* **334**, 141-53 (1983).
175. Myllykoski, M., Kuczera, K. & Kursula, P. Complex formation between calmodulin and a peptide from the intracellular loop of the gap junction protein connexin43: Molecular conformation and energetics of binding. *Biophysical chemistry* **144**, 130-5 (2009).
176. Naganuma, K., Inoue, M., Yamamura, K., Hanada, K. & Yamada, Y. Tongue and jaw muscle activities during chewing and swallowing in freely behaving rabbits. *Brain research* **915**, 185-94 (2001).
177. Nagy, J.I., Ochalski, P.A., Li, J. & Hertzberg, E.L. Evidence for the co-localization of another connexin with connexin-43 at astrocytic gap junctions in rat brain. *Neuroscience* **78**, 533-48 (1997).
178. Nagy, J.I., Patel, D., Ochalski, P. a & Stelmack, G.L. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* **88**, 447-68 (1999).
179. Nakamura, Y. & Katakura, N. Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neuroscience research* **23**, 1-19 (1995).
180. Nakamura, Y., Katakura, N. & Nakajima, M. Generation of rhythmical ingestive activities of the trigeminal, facial, and hypoglossal motoneurons in in vitro CNS preparations isolated from rats and mice. *Journal of medical and dental sciences* **46**, 63-73 (1999).
181. Narayanan, C.H., Fox, M.W. & Hamburger, V. Prenatal development of spontaneous and evoked activity in the rat (*Rattus norvegicus albinus*). *Behaviour* **40**, 100-34 (1971).
182. Narita, N. et coll. Effects on mastication of reversible bilateral inactivation of the lateral pericentral cortex in the monkey (*Macaca fascicularis*). *Archives of oral biology* **47**, 673-88 (2002).

183. Newman, E.A. High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science (New York, N.Y.)* **233**, 453-4 (1986).
184. Nicholson, C. Modulation of extracellular calcium and its functional implications. *Federation proceedings* **39**, 1519-23 (1980).
185. Nicholson, C., Ten Bruggencate, G., Stockle, H. & Steinberg, R. Calcium and potassium changes in extracellular microenvironment of cat cerebellar cortex. *Journal of neurophysiology* **41**, 1026 (1978).
186. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J.N.D. & Helmchen, F. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature methods* **1**, 31-7 (2004).
187. Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S. & Itohara, S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 4037-42 (2002).
188. Nozaki, S., Iriki, A. & Nakamura, Y. Trigeminal premotor neurons in the bulbar parvocellular reticular formation participating in induction of rhythmical activity of trigeminal motoneurons by repetitive stimulation of the cerebral cortex in the guinea pig. *Journal of neurophysiology* **69**, 595-608 (1993).
189. Nozaki, S., Iriki, A. & Nakamura, Y. Role of corticobulbar projection neurons in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *Journal of neurophysiology* **55**, 826-45 (1986).
190. Nozaki, S., Iriki, A. & Nakamura, Y. Localization of central rhythm generator involved in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *Journal of neurophysiology* **55**, 806-25 (1986).
191. Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S. & Nedergaard, M. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in neurosciences* **29**, 547-53 (2006).
192. Ogata, K. & Kosaka, T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* **113**, 221-33 (2002).
193. Olsson, K.A., Sasamoto, K. & Lund, J.P. Modulation of transmission in rostral trigeminal sensory nuclei during chewing. *Journal of neurophysiology* **55**, 56-75 (1986).
194. Olszewski, J. On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *The Journal of comparative neurology* **92**, 401-13 (1950).

195. Orkand, R.K., Nicholls, J.G. & Kuffler, S.W. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *Journal of neurophysiology* **29**, 788-806 (1966).
196. Orthmann-Murphy, J.L., Freidin, M., Fischer, E., Scherer, S.S. & Abrams, C.K. Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 13949-57 (2007).
197. Orellana, J. et al. Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**, 369-400 (2009).
198. Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y. & Sosinsky, G.E. Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10034-9 (2007).
199. Oury, F. et coll. Hoxa2- and rhombomere-dependent development of the mouse facial somatosensory map. *Science (New York, N.Y.)* **313**, 1408-13 (2006).
200. Parpura, V. et coll. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* **369**, 744-7 (1994).
201. Parri, H.R., Gould, T.M. & Crunelli, V. Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nature neuroscience* **4**, 803-12 (2001).
202. Pascual, O. et coll. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* **310**, 113 (2005).
203. Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T. & Carmignoto, G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 7817-30 (1997).
204. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set*. 209 (Academic Press: 2004).
205. Pelegriin, P. & Surprenant, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *The EMBO journal* **25**, 5071-82 (2006).
206. Penfield, W. Oligodendroglia and its relation to classical neuroglia. *Brain* **47**, 430-452 (1924).

207. Penfield, W. & Rasmussen, T. *The Cerebral Cortex of Man*. (MacMillan, New York.: 1950).
208. Perea, G. & Araque, A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *The Journal of neuroscience* **25**, 2192 (2005).
209. Perea, G. & Araque, A. Synaptic information processing by astrocytes. *Journal of physiology, Paris* **99**, 92-7 (2006).
210. Peyron, M.A., Lassauzay, C. & Woda, A. Effects of increased hardness on jaw movement and muscle activity during chewing of visco-elastic model foods. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* **142**, 41-51 (2002).
211. Peyron, M.-A., Blanc, O., Lund, J.P. & Woda, A. Influence of age on adaptability of human mastication. *Journal of neurophysiology* **92**, 773-9 (2004).
212. Pfahnl, A. & Dahl, G. Gating of cx46 gap junction hemichannels by calcium and voltage. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* **437**, 345-53 (1999).
213. Pfrieger, F.W. & Barres, B.A. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science (New York, N.Y.)* **277**, 1684-7 (1997).
214. Pinganaud, G., Bernat, I., Buisseret, P. & Buisseret-Delmas, C. Trigeminal projections to hypoglossal and facial motor nuclei in the rat. *The Journal of comparative neurology* **415**, 91-104 (1999).
215. Ponsaerts, R. et coll. Intramolecular loop/tail interactions are essential for connexin 43-hemichannel activity. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 4378-95 (2010).
216. Porter, J.T. & McCarthy, K.D. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 5073-81 (1996).
217. Pumain, R. & Heinemann, U. Stimulus- and amino acid-induced calcium and potassium changes in rat neocortex. *Journal of neurophysiology* **53**, 1-16 (1985).
218. Quist, a P., Rhee, S.K., Lin, H. & Lal, R. Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. *The Journal of cell biology* **148**, 1063-74 (2000).
219. Ramon Y Cajal, S. *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. 983 (Maloine: Paris, 1909).

220. Ramón y Cajal, S. Contribucion al conocimiento de la neurogli del cerebro humano. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid.* **11**, 255-315 (1913).
221. Retamal, M. a et coll. Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 13781-92 (2007).
222. Reynolds, B.A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)* **255**, 1707-10 (1992).
223. Rivera, C. et coll. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251-5 (1999).
224. Rossignol, S. & Dubuc, R. Spinal pattern generation. *Current opinion in neurobiology* **4**, 894-902 (1994).
225. Rouach, N., Tencé, M., Glowinski, J. & Giaume, C. Costimulation of N-methyl-D-aspartate and muscarinic neuronal receptors modulates gap junctional communication in striatal astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1023-8 (2002).
226. Rusakov, D.A. The role of perisynaptic glial sheaths in glutamate spillover and extracellular Ca²⁺ depletion. *Biophysical journal* **81**, 1947-59 (2001).
227. Rusakov, D.A. & Fine, A. Extracellular Ca²⁺ depletion contributes to fast activity-dependent modulation of synaptic transmission in the brain. *Neuron* **37**, 287-97 (2003).
228. Sáez, J.C., Retamal, M. a, Basilio, D., Bukauskas, F.F. & Bennett, M.V.L. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* **1711**, 215-24 (2005).
229. Saffitz, J.E., Laing, J.G. & Yamada, K.A. Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circulation research* **86**, 723-8 (2000).
230. Sandler, V.M., Puil, E. & Schwarz, D.W. Intrinsic response properties of bursting neurons in the nucleus principalis trigemini of the gerbil. *Neuroscience* **83**, 891-904 (1998).
231. Scemes, E., Suadicani, S.O., Dahl, G. & Spray, D.C. Connexin and pannexin mediated cell—cell communication. *Neuron glia biology* **3**, 199 (2007).

232. Schipke, C.G., Haas, B. & Kettenmann, H. Astrocytes discriminate and selectively respond to the activity of a subpopulation of neurons within the barrel cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **18**, 2450-9 (2008).
233. Schools, G.P., Zhou, M. & Kimelberg, H.K. Development of gap junctions in hippocampal astrocytes: evidence that whole cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell. *Journal of neurophysiology* **96**, 1383 (2006).
234. Schummers, J., Yu, H. & Sur, M. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science (New York, N.Y.)* **320**, 1638-43 (2008).
235. Schwartz, G., Enomoto, S., Valiquette, C. & Lund, J.P. Mastication in the rabbit: a description of movement and muscle activity. *Journal of neurophysiology* **62**, 273-87 (1989).
236. Scott, G., Westberg, K.G., Vrentzos, N., Kolta, A. & Lund, J.P. Effect of lidocaine and NMDA injections into the medial pontobulbar reticular formation on mastication evoked by cortical stimulation in anaesthetized rabbits. *The European journal of neuroscience* **17**, 2156-62 (2003).
237. Serrano, A., Robitaille, R. & Lacaille, J.-C. Differential NMDA-dependent activation of glial cells in mouse hippocampus. *Glia* **56**, 1648-63 (2008).
238. Sherrington, C.S. Reflexes elicitable in the cat from pinna vibrissae and jaws. *The Journal of physiology* **51**, 404-31 (1917).
239. Shigenaga, Y. et coll. Oral and facial representation in the trigeminal principal and rostral spinal nuclei of the cat. *The Journal of comparative neurology* **244**, 1-18 (1986).
240. Shigenaga, Y. et coll. Topographic representation of lower and upper teeth within the trigeminal sensory nuclei of adult cat as demonstrated by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *The Journal of comparative neurology* **251**, 299-316 (1986).
241. Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q.S. & Nedergaard, M. Signaling at the gliovascular interface. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 9254-62 (2003).
242. Smith, S.J. Do astrocytes process neural information? *Progress in brain research* **94**, 119-36 (1992).
243. Snow, A.D. et coll. Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-

- Jakob disease and scrapie. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **63**, 601-11 (1990).
244. Somjen, G.G. Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* **1**, 2-9 (1988).
 245. Somjen, G.G. Stimulus-evoked and seizure-related responses of extracellular calcium activity in spinal cord compared to those in cerebral cortex. *Journal of neurophysiology* **44**, 617-32 (1980).
 246. Spray, D.C., Ye, Z.C. & Ransom, B.R. Functional connexin “hemichannels”: a critical appraisal. *Glia* **54**, 758-73 (2006).
 247. Spray, D.C., Rozental, R. & Srinivas, M. Prospects for rational development of pharmacological gap junction channel blockers. *Current drug targets* **3**, 455-64 (2002).
 248. Srinivas, M., Calderon, D.P., Kronengold, J. & Verselis, V.K. Regulation of connexin hemichannels by monovalent cations. *The Journal of general physiology* **127**, 67-75 (2006).
 249. Srinivas, M., Kronengold, J., Bukauskas, F.F., Bargiello, T.A. & Verselis, V.K. Correlative studies of gating in Cx46 and Cx50 hemichannels and gap junction channels. *Biophysical journal* **88**, 1725-39 (2005).
 250. Steindler, D.A. Glial boundaries in the developing nervous system. *Annual review of neuroscience* **16**, 445-70 (1993).
 251. Stout, C. & Charles, A. Modulation of intercellular calcium signaling in astrocytes by extracellular calcium and magnesium. *Glia* **43**, 265–273 (2003).
 252. Stout, C.E.C., Costantin, J.J.L., Naus, C.C.C.G. & Charles, A.C.A.C. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 10482 (2002).
 253. Stridh, M.H., Tranberg, M., Weber, S.G., Blomstrand, F. & Sandberg, M. Stimulated efflux of amino acids and glutathione from cultured hippocampal slices by omission of extracellular calcium: likely involvement of connexin hemichannels. *The Journal of biological chemistry* **283**, 10347-56 (2008).
 254. Stringer, J.L., Mukherjee, K., Xiang, T. & Xu, K. Regulation of extracellular calcium in the hippocampus in vivo during epileptiform activity--role of astrocytes. *Epilepsy research* **74**, 155-62 (2007).
 255. Su, H., Alroy, G., Kirson, E.D. & Yaari, Y. Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal

- neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 4173-82 (2001).
256. Suadicani, S.O., Brosnan, C.F. & Scemes, E. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 1378-85 (2006).
 257. Syková, E. Extracellular space volume and geometry of the rat brain after ischemia and central injury. *Advances in neurology* **73**, 121-35 (1997).
 258. Szoke, K. et coll. Glycine transporter 1 expression in the ventral respiratory group is restricted to protoplasmic astrocytes. *Brain research* **1119**, 182-9 (2006).
 259. Takata, N. & Hirase, H. Cortical layer 1 and layer 2/3 astrocytes exhibit distinct calcium dynamics in vivo. *PLoS One* **3**, e2525 (2008).
 260. Takemura, M., Sugimoto, T. & Shigenaga, Y. Difference in central projection of primary afferents innervating facial and intraoral structures in the rat. *Experimental neurology* **111**, 324-31 (1991).
 261. Tanaka, S., Kogo, M., Chandler, S.H. & Matsuya, T. Localization of oral-motor rhythmogenic circuits in the isolated rat brainstem preparation. *Brain research* **821**, 190-9 (1999).
 262. Taylor, C.P. & Dudek, F.E. Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science (New York, N.Y.)* **218**, 810-2 (1982).
 263. Tazerart, S., Vinay, L. & Brocard, F. The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 8577-89 (2008).
 264. Teaforde, M. & Walker, A. Prenatal jaw movements in the guinea pig, *Cavia porcellus*; evidence from patterns of tooth wear. *J. Mammalia* **64**, 534-536 (1983).
 265. Theodosis, D.T., Poulain, D.A. & Oliet, S.H.R. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological reviews* **88**, 983 (2008).
 266. Travers, J.B. & Norgren, R. Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *The Journal of comparative neurology* **220**, 280-98 (1983).

267. Tsuboi, A., Kolta, A., Chen, C.C. & Lund, J.P. Neurons of the trigeminal main sensory nucleus participate in the generation of rhythmic motor patterns. *European Journal of Neuroscience* **17**, 229-238 (2003).
268. Turman, J. & Chandler, S.H. Immunohistochemical evidence for GABA and glycine-containing trigeminal premotoneurons in the guinea pig. *Synapse (New York, N.Y.)* **18**, 7-20 (1994).
269. Turman, J.E. The development of mastication in rodents: from neurons to behaviors. *Archives of oral biology* **52**, 313-6 (2007).
270. Verselis, V. & Srinivas, M. Divalent cations regulate connexin hemichannels by modulating intrinsic voltage-dependent gating. *The Journal of general physiology* **132**, 315 (2008).
271. Verselis, V.K.V., Trelles, M.P.M., Rubinos, C., Bargiello, T.A. & Srinivas, M. Loop gating of connexin hemichannels involves movement of pore-lining residues in the first extracellular loop domain. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 4484 (2009).
272. Virchow, R. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. 1024 (Meidinger: 1856).
273. Virginio, C., Church, D., North, R.A. & Surprenant, A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* **36**, 1285-94 (1997).
274. Vives, V., Alonso, G., Solal, A.C., Joubert, D. & Legraverend, C. Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *The Journal of comparative neurology* **457**, 404-19 (2003).
275. Waite, P.M., Ho, S.M. & Henderson, T.A. Afferent ingrowth and onset of activity in the rat trigeminal nucleus. *The European journal of neuroscience* **12**, 2781-92 (2000).
276. Wallraff, A. et coll. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *The Journal of neuroscience* **26**, 5438 (2006).
277. Wallraff, A., Odermatt, B., Willecke, K. & Steinhäuser, C. Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* **48**, 36-43 (2004).
278. Walz, W. Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia* **31**, 95-103 (2000).

- 279. Walz, W. & Hertz, L. Comparison between fluxes of potassium and of chloride in astrocytes in primary cultures. *Brain research* **277**, 321-8 (1983).
- 280. Wang, D.D. & Bordey, A. The astrocyte odyssey. *Progress in neurobiology* **86**, 342-67 (2008).
- 281. Wang, X. et coll. Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nature* **9**, 816-823 (2006).
- 282. Westberg, K., Clavelou, P., Sandström, G. & Lund, J.P. Evidence that trigeminal brainstem interneurons form subpopulations to produce different forms of mastication in the rabbit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 6466-79 (1998).
- 283. Westneat, M.W. & Hal, W.G. Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: An electromyographic analysis of suckling and chewing. *Behavioral neuroscience* **106**, 539 (1992).
- 284. Willoughby, J.O. et coll. Fluorocitrate-mediated astroglial dysfunction causes seizures. *Journal of neuroscience research* **74**, 160–166 (2003).
- 285. Xiang, C. et coll. The transcription factor, Lmx1b, is necessary for development of the principal trigeminal nucleus-based lemniscal pathway. *Molecular and Cellular Neuroscience* **44**, 394-403 (2010).
- 286. Xiong, Z.Q. & Stringer, J.L. Astrocytic regulation of the recovery of extracellular potassium after seizures in vivo. *The European journal of neuroscience* **11**, 1677-84 (1999).
- 287. Yamada, Y., Yamamura, K. & Inoue, M. Coordination of cranial motoneurons during mastication. *Respiratory physiology & Neurobiology* **147**, 177–189 (2005).
- 288. Yamamoto, M. et coll. The somatotopic organization of trigeminal premotoneurons in the cat brainstem. *Brain research* **1149**, 111-7 (2007).
- 289. Yamamura, K. et coll. Effects of reversible bilateral inactivation of face primary motor cortex on mastication and swallowing. *Brain research* **944**, 40-55 (2002).
- 290. Ye, Z.-C., Wyeth, M.S., Baltan-Tekkok, S. & Ransom, B.R. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 3588-96 (2003).
- 291. Yeh, T.-H., Lee, D.Y., Gianino, S.M. & Gutmann, D.H. Microarray analyses reveal regional astrocyte heterogeneity with implications for neurofibromatosis type 1 (NF1)-regulated glial proliferation. *Glia* **57**, 1239-49 (2009).

292. Yoshida, A. et coll. Morphologic characteristics of physiologically defined neurons in the cat trigeminal nucleus principalis. *The Journal of comparative neurology* **401**, 308-28 (1998).
293. Young, J.K. et coll. An astrocyte toxin influences the pattern of breathing and the ventilatory response to hypercapnia in neonatal rats. *Respiratory physiology & neurobiology* **147**, 19-30 (2005).
294. Zanotti, S. & Charles, A. Extracellular calcium sensing by glial cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intercellular signaling. *Journal of neurochemistry* **69**, 594-602 (1997).
295. Zhang, Y. & Barres, B.A. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Current opinion in neurobiology* **20**, 588-94 (2010).
296. Zhong, G., Masino, M.A. & Harris-Warrick, R.M. Persistent sodium currents participate in fictive locomotion generation in neonatal mouse spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 4507-18 (2007).
297. Zhou, M. & Kimelberg, H.K. Freshly isolated astrocytes from rat hippocampus show two distinct current patterns and different [K(+)](o) uptake capabilities. *Journal of neurophysiology* **84**, 2746-57 (2000).
298. Zhou, M. & Kimelberg, H.K. Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *The Journal of Neuroscience* **21**, 7901 (2001).
299. Zhou, M., Schools, G.P. & Kimelberg, H.K. Development of GLAST(+) astrocytes and NG2(+) glia in rat hippocampus CA1: mature astrocytes are electrophysiologically passive. *Journal of neurophysiology* **95**, 134-43 (2006).
300. Zhou, M. et coll. TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 8551-64 (2009).
301. Zhou, Y. et coll. Identification of the calmodulin binding domain of connexin 43. *The Journal of biological chemistry* **282**, 35005-17 (2007).
302. Zonta, M. et coll. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature neuroscience* **6**, 43-50 (2003).